



## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/147592>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-05 and may be subject to change.

1544

**DE POLYPEPTIDE - KETENS**

**van  $\alpha$ -CRYSTALLINE**

**A.E. LEON**



D E P O L Y P E P T I D E - K E T E N S

VAN  $\alpha$ -CRYSTALLINE

PROMOTOR: PROF.DR. H. BLOEMENDAL

D E P O L Y P E P T I D E - K E T E N S  
VAN  $\alpha$ -CRYSTALLINE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WISKUNDE  
EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT  
TE NIJMEGEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
DR. G. BRENNINKMEIJER, HOOGLERAAR IN DE  
FACULTEIT DER SOCIALE WETENSCHAPPEN, VOLGENS BESLUIT  
VAN DE SENAAT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP  
DONDERDAG 24 SEPTEMBER 1970  
DES NAMIDDAGS TE VIER UUR.

door

ALAIN ELIE LEON  
GEBOREN TE ALEXANDRIE

Druk: Offsetdrukkerij Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen  
Nijmegen

Zeer in het bijzonder ben ik dr. H. Hoenders dank verschuldigd voor zijn interesse en steun tijdens dit onderzoek.

Dr. K. de Groot wil ik bedanken voor zijn actieve stimulering en medewerking. Dr. J. Gerding ben ik dankbaar voor zijn ontwikkelingswerk op het gebied van de automatisering van de aminozuur-analyses. Van dr. J. Schoenmakers leerde ik vol te houden in de ingeslagen weg, ook hem mijn dank. Voor de heer G. Groenewoud die vaak in zijn vrije tijd bereid was monsters voor mij te analyseren, is een dankwoord zeker op zijn plaats evenals voor de heer J. Reynen voor het uitvoeren van ultracentrifuge-analyses. Drs. K. Liem ben ik erkentelijk voor haar deskundige instructies op het gebied van de elektro-isofocussing evenals de heer A. Koppers die technische problemen vaak wist op te lossen.

De heer van Hout en medewerkers van de fotografische afdeling en de heer Maas wil ik bij deze hartelijk dank zeggen voor de zeer vlotte en uitstekende uitvoering van de tekeningen.

Deze onderzoeken werden uitgevoerd onder auspiciën van de Stichting Scheikundig Onderzoek in Nederland (S.O.N.) met financiële steun van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek.

A A N M I J N D O C H T E R  
L I N D A



# LIJST VAN AFKORTINGEN

A	"zure" subeenheid van $\alpha$ -crystalline
B	"basische" subeenheid van $\alpha$ -crystalline
A <sub>1</sub>	polypeptide-keten van A
A <sub>2</sub>	polypeptide-keten van A
B <sub>1</sub>	polypeptide-keten van B
B <sub>2</sub>	polypeptide-keten van B
CM- $\alpha$ -	carboxymethyl $\alpha$ -crystalline
DANSYL	dimethylaminonafaleensulfonyl
DEAE	diethylaminoethyl
DFP	diisopropylfluorofosfaat
DNFB	dinitrofluorobenzeen
EDTA	ethyleendiaminetetraacetaat
LAP	leucineaminopeptidase
QAE	quaternair ethylammonium
SDS	sodiumdodecylsulfaat
SE	sulfoethyl
TCA	trichloorazijnzuur
TEMED	N, N, N, N' tetramethyleendiamine
TPCK	l-tosylamido-2-phenylethylchloromethylketon
TRIS	trishydroxymethylaminoethaan

## HOOFDSTUK I

ALGEMENE INLEIDING . . . . .	1
------------------------------	---

## HOOFDSTUK II

BEREIDING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE . . . . .	5
---	---

II.1. Inleiding . . . . .	5
---------------------------	---

### II.2. BEREIDING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE VOLGENS DE GEWIJZIGDE METHODE VAN

SPECTOR . . . . .	6
-------------------	---

II.2.1. Materialen en methoden . . . . .	6
--	---

Gelfiltratie op Sephadex G200 . . . . .	7
---	---

Sedimentatie-analyse . . . . .	7
--------------------------------	---

Polyacrylamidegel-elektroforese . . . . .	8
---	---

II.2.2. Resultaten en discussie. . . . .	9
--	---

Chromatografische scheiding van "zink- $\alpha$ -crystalline" . . . . .	9
---	---

Berekening van de opbrengst. . . . .	10
--------------------------------------	----

Onderzoek van de verschillende zuiveringsstappen m.b.v. de ultracentrifuge . . . . .	10
---	----

Polyacrylamidegel-elektroforese. . . . .	12
--	----

II.3. ISOLERING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE DOOR MIDDEL VAN CONTINUE VRIJE ELEKTROFORESE . . . . .	13
II.3.1. Materialen en methoden . . . . .	13
Bereiding van de lenseiwitten . . . . .	13
De elektroforetische scheiding . . . . .	13
Analyse m.b.v. de analytische ultracentrifuge . . . . .	14
Bepaling van leucineaminopeptidase activiteit . . . . .	14
Scheiding van $\alpha$ -crystalline van leucineaminopeptidase . . . . .	14
II.3.2. Resultaten en discussie . . . . .	15
Scheiding van de wateroplosbare lenseiwitten . . . . .	15
Zuivering van $\alpha$ -crystalline d.m.v. gelfiltratie op Sepharose 6B . . . . .	16
HOOFDSTUK III	
ONDERZOEK NAAR DE POLYPEPTIDE-KETENS VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE . . . . .	18
III.1. Inleiding . . . . .	18
III.2. Materialen en methoden . . . . .	19
N-terminale aminozuur . . . . .	19
C-terminale aminozuren . . . . .	19
Bereiding van carboxymethyl $\alpha$ -crystalline. . . . .	19
Chromatografische scheiding van $\alpha$ -crystalline in de subeenheden A en B . . . . .	20
Chromatografische scheiding van subeenheid B in polypeptide-keten . . . . .	20
Scheiding van subeenheid A in polypeptide-ketens . . . . .	21
Aminozuur-analyses . . . . .	21
III.3. Resultaten en discussie . . . . .	21
N-terminale aminozuur . . . . .	21
C-terminale aminozuren . . . . .	22
Scheiding van $\alpha$ -crystalline in subeenheden op SE Sephadex . . . . .	22
Scheiding van de subeenheden op DEAE Sephadex A50 . . . . .	23
Scheiding van de polypeptide-ketens $A_1$ en $A_2$ . . . . .	24
Scheiding van de polypeptide-ketens van subeenheid B op QAE Sephadex . . . . .	25

Scheiding van de polypeptide-ketens van subeenheid B d.m.v. isofocussing . . . . .	26
Polyacrylamidegel-elektroforese van subeenheden A en B . . . .	26
Aminozuur-analyses . . . . .	27
Peptide-kaarten . . . . .	29

#### HOOFDSTUK IV

MOLECULAIRGEWICHTSBEPALING VAN DE SUBEENHEDEN VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE . . .	32
---	----

IV.1. Moleculairgewichtsbepaling volgens Archibald . . . . .	32
--	----

IV.1.1. Inleiding . . . . .	32
-----------------------------	----

IV.1.2. Materialen en methoden . . . . .	33
--	----

Uitgangsmateriaal . . . . .	33
-----------------------------	----

Moleculairgewichtsbepalingen . . . . .	33
--	----

Eindgroepbepalingen . . . . .	33
-------------------------------	----

De dansylmethode . . . . .	33
----------------------------	----

De DNFB methode . . . . .	34
---------------------------	----

De cyanaatmethode . . . . .	34
-----------------------------	----

IV.1.3. Resultaten en discussie . . . . .	36
---	----

Invloed van verschillende dissocierende media . . . . .	37
---	----

De dansylmethode . . . . .	37
----------------------------	----

De cyanaatmethode . . . . .	38
-----------------------------	----

IV.2. Moleculairgewichtsbepaling volgens Katz . . . . .	39
---	----

IV.2.1. Inleiding . . . . .	39
-----------------------------	----

IV.2.2. Materialen en methoden . . . . .	39
--	----

Isolatieprocedure . . . . .	39
-----------------------------	----

Aminozuur-analyses . . . . .	39
------------------------------	----

Afbraak m.b.v. trypsine . . . . .	39
-----------------------------------	----

Hoogspanningselektroforese . . . . .	40
--------------------------------------	----

Papierchromatografie . . . . .	40
--------------------------------	----

Moleculairgewichtsbepaling . . . . .	40
--------------------------------------	----

IV.2.3. Resultaten en discussie . . . . .	41
---	----

Aminozuur-analyses . . . . .	42
------------------------------	----

Bepaling van het minimum molgewicht . . . . .	43
---	----

Peptide-kaarten . . . . .	44
---------------------------	----

## HOOFDSTUK V

ONDERZOEK NAAR DE N-TERMINUS VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE . . . . .	45
V.1. Inleiding . . . . .	45
V.2. Materialen en methoden . . . . .	46
Inwerking van pronase . . . . .	46
Inwerking van subtilisine . . . . .	46
Isolatie van N-terminale geblokkeerde peptiden . . . . .	46
Sequentie-bepaling . . . . .	47
Hoogspanningselektroforese . . . . .	47
Dunnelaag-chromatografie . . . . .	47
Reactie op koolhydraten . . . . .	48
Reactie op formyl-groepen . . . . .	48
Kwalitatieve acetyl-bepaling . . . . .	49
Kwantitatieve acetyl-bepaling . . . . .	49
V.3. Resultaten en discussie . . . . .	49
Gaschromatografische acetyl-bepaling . . . . .	50
Sequentie van de geblokkeerde tetrapeptide . . . . .	50

## HOOFDSTUK VI

SCHEIDING EN BRUTO AMINOZUURSAMENSTELLING VAN OPLOSBAAR TRYPTISCHE PEPTIDEN VAN SUBEENHEID A . . . . .	51
VI.1. Inleiding . . . . .	51
VI.2. Materialen en methoden . . . . .	52
Isolatie van het N-terminale tryptische peptide van subeenheid A . . . . .	52
Blokking en deblokking van de $\epsilon$ -aminogroep van lysine. . . . .	52
Isolatie van het gemodificeerde N-terminale tryptische peptide d.m.v. continue vrije elektroforese . . . . .	52
Hoogspanningselektroforese op papier en dunnelaag-chromatografie . . . . .	53
Tryptofaan en tyrosine-gehalte . . . . .	53
Gelfiltratie van tryptische peptiden op Sephadex G50 . . . . .	54

Scheiding van tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese . . . . .	54
Chromatografische scheiding van tryptische peptiden op Dowex 1 . . . . .	54
Scheiding van tryptische peptiden volgens de "finger-printing" methode . . . . .	55
VI.3. Resultaten en discussie . . . . .	56
Isolatie van het N-terminale tryptische peptide van subeenheid A . . . . .	56
Isolatie van het gemodificeerde N-terminale tryptische peptide van subeenheid A . . . . .	56
Gelfiltratie van tryptische peptiden op Sephadex G50 . . . . .	57
Scheiding van tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese . . . . .	57
Chromatografie op Dowex 1-X2 . . . . .	59
Peptide-kaarten . . . . .	61
Bepaling van tyrosine en tryptofaan . . . . .	61
SAMENVATTING . . . . .	62
SUMMARY . . . . .	64
LITERATUUR . . . . .	66

## ALGEMENE INLEIDING

De oplosbare ooglenseiwitten van zoogdieren kunnen in drie klassen worden ingedeeld nl.  $\alpha$ ,  $\beta$ - en  $\gamma$ -crystalline. Deze indeling kwam het eerst tot stand toen Mörner (1894) gefractioneerde precipitatie van de verschillende lenseiwitten trachtte te verwezenlijken. Bij pH 5,0 sloeg  $\alpha$ -crystalline neer,  $\beta$ -crystalline precipiteerde bij pH 6, terwijl  $\gamma$ -crystalline pas bij hoge ammoniumsulfaat-concentratie precipiteerbaar was. De in water onoplosbare fractie uit lensextrakt wordt algemeen als albuminoïd aangeduid.

De elektroforetische mobiliteit van de  $\alpha$ -fractie bij alkalische pH was het grootst, daarop volgde de  $\beta$ -fractie, terwijl de  $\gamma$ -fractie de kleinste mobiliteit had.

Wanneer men de oplosbare lenseiwitten aan gelfiltratie op Sephadex G200 onderwerpt, blijkt  $\alpha$ -crystalline het eerst geëluëerd te worden en dus het hoogste moleculairgewicht te hebben, gevolgd door  $\beta$ -crystalline en tenslotte  $\gamma$ -crystalline.

Dit proefschrift handelt over  $\alpha$ -crystalline dat thans als volgt gedefinieerd kan worden:

Alpha-crystalline is een oplosbare eiwitfractie uit ooglensextrakt, die bij pH 5,0 precipiteerbaar is, de hoogste mobiliteit in alkalisch milieu bij vrije elektroforese heeft en die het hoogste moleculairgewicht bezit.

Aanvankelijk was het doel van dit onderzoek een eerste benadering tot de opheldering van de primaire structuur van  $\alpha$ -crystalline, uit runderooglenzen. Alvorens dit echter met succes kon worden gerealiseerd, moest een aantal problemen worden opgelost:

- a. Het kiezen van een bereidingswijze, die zuiver uitgangsmateriaal in grote hoeveelheden waarborgt (hoofdstuk II).
- b. Het bepalen van het aantal verschillende polypeptide-ketens in het eiwit en de isolatie hiervan (hoofdstuk III).
- c. Het bepalen van het moleculairgewicht van de polypeptide-ketens ten einde het te verwachten aantal aminozuur residueën vast te kunnen stellen (hoofdstuk IV).
- d. De scheiding van, door enzymatische afbraak verkregen, peptiden en de bruto aminozuursamenstelling hiervan (hoofdstuk V en VI).

Deze problemen zijn in de loop van de jaren 1966 - 1970 ten dele in ons laboratorium opgelost en pas daardoor werd de weg naar de eigenlijke sequentie-opheldering opengesteld.

Stand van kennis omtrent runder  $\alpha$ -crystalline bij het begin van het onderzoek

#### Bereidingsmethoden voor $\alpha$ -crystalline

Verschillende bereidingswijzen van  $\alpha$ -crystalline waren in de literatuur beschreven. Deze methoden omvatten protamineprecipitatie (Orzalesi en Miglior 1951), ammoniumsulfaatprecipitatie (Orekhovich en Firfarova 1954), isoëlektrische precipitatie (François et al 1955), zetmeelblok-elektroforese (Bloemendal 1956), gordijnelektroforese op papier (Wood et al 1959, 1961), (Manski et al 1961), chromatografie op DEAE cellulose (Papaconstantinou 1958, 1959, 1962), (Spector 1960), dichtheidsgradient-centrifugatie (Bloemendal et al 1964) en gelchromatografie op Sephadex G200 (van Dam en ten Cate 1966).



## Moleculairgewicht van $\alpha$ -crystalline

De opgaven voor het moleculairgewicht van  $\alpha$ -crystalline varieerden tussen 770.000 (Papaconstantinou 1962) tot 1.150.000 (Papaconstantinou 1962). Blijkbaar afhankelijk van de isolatiemethode worden aggregaten van verschillende grootte geïsoleerd. De discrepanties in de gevonden waarden van het moleculairgewicht zijn waarschijnlijk te wijten aan meetfouten en heterogeniteit van  $\alpha$ -crystalline. De sedimentatiecoëfficiënten bepaald bij extreme pH's of in aanwezigheid van ureum (Bloemendal et al 1962), (Bont et al 1962) waren veel lager dan die van natief  $\alpha$ -crystalline. Deze bevindingen samen met het polyacrylamidegel-patroon in 7M ureum bij pH 8,9 (Bloemendal et al 1962) bevestigden de verwachting dat  $\alpha$ -crystalline een quaternaire structuur bezit.

## Aminozuur-analyses van $\alpha$ -crystalline

Aminozuur-analyses van  $\alpha$ -crystalline uitgevoerd door verschillende onderzoekers (Björk 1963, Spector 1965, Waley 1965, Wisse et al 1966, van Dam 1967) kwamen redelijk met elkaar overeen, hetgeen als bewijs kon gelden dat de verschillende isolatiemethoden hetzelfde preparaat opleverden. Opvallend was het lage cysteïnegehalte in  $\alpha$ -crystalline. Tevens werd door Waley (1965) vastgesteld dat disulfide bruggen niet aanwezig zijn.

## Sequentie-analyse van $\alpha$ -crystalline

Gegevens omtrent de primaire structuur van  $\alpha$ -crystalline waren beperkt tot de sequentie rondom het cysteïne residue, vastgesteld door Mok en Waley (1967) nl. Ser-Cys-Ser-Leu.

Van Dam en ten Cate (1966) stelden vast dat serine het C-terminale aminozuur was. Als N-terminale aminozuur vond Bloemendal (1957) glutaminezuur, in te geringe hoeveelheid echter om in overeenstemming gebracht te kunnen worden met het moleculairgewicht van de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline.

## Secundaire structuur van $\alpha$ -crystalline

Harmsen et al (1966) stelden d.m.v. optische rotatie-dispersie vast, dat  $\alpha$ -crystalline een zeer laag  $\alpha$ -helix gehalte heeft en dat het molecuul een " $\beta$ -pleated sheet" structuur heeft. Aangenomen wordt dat  $\alpha$ -crystalline voor 50% de  $\beta$ -structuur heeft en voor 50% in de "random-coil" vorm aanwezig is.

## Tertiaire en quaternaire structuur

De kennis omtrent de tertiaire en quaternaire structuur van  $\alpha$ -crystalline was uiterst summier. Het aantal verschillende polypeptide-ketens werd zeer verschillend geschat. Polyacrylamidegel-elektroforese in basisch milieu in 7M ureum leverde tot veertien banden op, terwijl in zuur milieu het aantal tot twee beperkt bleef.

## HOOFDSTUK II

### BEREIDING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE

#### II.1. INLEIDING

Verschillende isolatie-technieken voor de bereiding van  $\alpha$ -crystalline zijn in de literatuur beschreven (zie algemene inleiding, hoofdstuk I).

De daarbij gebruikte methodieken omvatten:

1. gefractioneerde precipitatie
2. elektroforese
3. chromatografie op ionenwisselaars
4. gelchromatografie volgens het moleculaire zeef-principe.

De keuze van een methode is mede afhankelijk van het doel dat men nastreeft.

Gelchromatografie en chromatografie op ionenwisselaars zijn betrekkelijk milde methoden maar zijn vaak tijdrovend en leveren relatief weinig materiaal op, wanneer men deze als enige zuiveringsstap wil gebruiken.

De isolatie van  $\alpha$ -crystalline d.m.v. precipitatie, hetzij met zinkionen

(Spector 1964), hetzij met ammoniumsulfaat of eenvoudiger de isoëlektrische precipitatie levert wel veel  $\alpha$ -crystalline op, dat echter gecontamineerd is met  $\beta$  en  $\gamma$ -crystallines die gedeeltelijk co-precipiteren.

De tot dusver ontwikkelde elektroforetische scheidingen van  $\alpha$ -crystalline van de andere lenseiwitten nl. zetmeelblok-elektroforese (Bloemendal 1957) en pevikonblok-elektroforese (Wisse et al 1966) zijn milde methoden maar leveren per "run" slechts 50 mg zuiver  $\alpha$ -crystalline op.

Om aan de steeds groter wordende behoefte aan zuiver  $\alpha$ -crystalline voor het structuur-onderzoek tegemoet te komen, werd een methode ontwikkeld, die een combinatie is van precipitatie-technieken met gelfiltratie. Dit werk resulteerde in een bereidingswijze, die hierna de gewijzigde methode van Spector genoemd werd.

Voor experimenten die natief  $\alpha$ -crystalline vereisten, werd een andere methode ontwikkeld, waarbij van een apparaat voor continue vrije elektroforese gebruik gemaakt werd.

## II.2. BEREIDING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE VOLGENS DE GEWIJZIGDE METHODE VAN SPECTOR

Spector beschreef in 1964 een methode om  $\alpha$ -crystalline van de andere lenseiwitten te scheiden d.m.v. precipitatie met zinkionen. De verkregen preparaten waren echter niet geheel vrij van lager moleculair materiaal, zoals bleek bij ultracentrifugatie. De aangebrachte wijzigingen bestonden hoofdzakelijk uit het toevoegen van een kleinere hoeveelheid zinkionen, hetgeen de opbrengst vergrootte en het laten volgen van gelchromatografie op de precipitatie, om co-precipiterende laagmoleculaire contaminaties te verwijderen.

### II.2.1. Materialen en methoden

Verse kalfsogen werden van het abattoir verkregen. De lenzen werden zo snel mogelijk eruit gehaald, gesuspenderd in koud water (3 ml per gram lens) en voorzichtig geroerd tot er alleen lens-kernen overbleven. De troebele oplossing werd 20 minuten bij 15.000 g gecentrifugeerd, waarna de heldere supernatant werd drooggevroren.

Tien gram drooggevroren lensextrakt werd opgelost in 200 ml 0,02M Tris HCl, pH 7,3. Aan de oplossing werd 5 ml 0,1M zinksulfaat toegevoegd, terwijl de pH constant werd gehouden door toevoeging van 0,1N loog. Vervolgens werd ijskoude ethanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 9%. De  $\beta$ - en  $\gamma$ -crystalline fracties sloegen neer en werden afgecentrifugeerd bij 15.000 g. De  $\alpha$ -crystalline bevattende supernatant, werd op pH 5,0 gebracht waarna de alcohol-concentratie op 13% gebracht werd. De suspensie werd na één nacht staan in de koude kamer afgecentrifugeerd. Het neerslag dat hierbij ontstond, bevatte hoofdzakelijk  $\alpha$ -crystalline. Het neerslag werd gesuspenderd in een kleine hoeveelheid water en drooggevroren. Dit eiwit preparaat werd genoemd "zink- $\alpha$ -crystalline".

#### Gelfiltratie op Sephadex G200

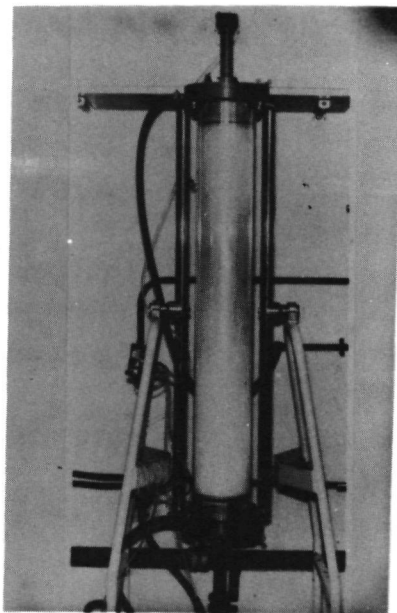
"Zink- $\alpha$ -crystalline" werd onderworpen aan gelchromatografie op Sephadex G200 om verdere zuivering te bewerkstelligen. Voor de scheiding werd gebruik gemaakt van kolommen van 60 cm lengte en 3 cm doorsnede. Op deze kolommen kon maximaal 1 g Zn- $\alpha$ -crystalline worden gezuiverd.

Voor de zuivering van grotere hoeveelheden eiwit werd de K 100/100 Pharmacia kolom gebruikt (zie fig. 1). Op deze kolom met een "bedvolume" van ongeveer 9 l, kon 5 g eiwit per run worden gezuiverd.

Voor de elutie werd een buffer gebruikt bevattende 0,1M Tris HCl, pH 7,3, 1M NaCl en 0,1 mM EDTA. Het eiwit werd in 60 ml buffer opgelost en ingebracht met een snelheid van 20 ml/uur. De elutie-buffer werd vervolgens doorgepompt met een snelheid van 100 ml/uur m.b.v. een peristaltische pomp. Fracties van 20 ml werden opgevangen in een automatische fractieverzamelaar. De extincties werden gemeten bij 280 nm m.b.v. een Uvicord (LKB).

#### Sedimentatie-analyse

Om het effect van iedere zuiveringsstap te onderzoeken, werden sedimentatiesnelheidsruns uitgevoerd in een Beckman-Spinco model E analytische ultracentrifuge uitgerust met Schlieren optiek. Als oplosmiddel werd 0,2M fosfaatbuffer, pH 7,6 in 0,9% NaCl gebruikt.



*Fig. 1 Sephadex kolom type K 100/100 voor preparatieve scheiding van  $\alpha$ -crystalline.*

*Kolomdimensies : 10 cm x 100 cm.*

*Elutiesnelheid : 100 ml per uur.*

#### Polyacrylamidegel-elektroforese

Als zuiverheidscriterium bij de bereiding van  $\alpha$ -crystalline en de subeenheden werd veelvuldig gebruik gemaakt van "disc"-elektroforese. De elektroforese werd uitgevoerd in een apparaat geleverd door de firma Pleuger, België. Het bovenvat bevatte een oplossing samengesteld uit: 16,6 ml 1M Tris HCl buffer, pH 8,9, 84 g ureum en 120 ml water en twee druppels broomfenolblauw. Het ondervat bevatte een oplossing gemaakt door 16,6 ml 1M Tris HCl buffer pH 8,9 te verdunnen met 183 ml water.

Voor de bereiding van 10% acrylamidegels werd gebruik gemaakt van de volgende standaard-oplossingen:

Oplossing A : 0,46 ml TEMED/100 ml 0,6M Tris-EDTA-boorzuur ("High Resolution" buffer, LKB)

Oplossing B : 25 mg  $K_2S_2O_5$ /100 ml  $H_2O$  (vers!)

Oplossing C : 40 gram acrylamide  
0,8 gram N,N'-bismethyleenacrylamide/100 ml  $H_2O$

Oplossing D : 30 mg  $K_3Fe(CN)_6$ /100 ml  $H_2O$

Oplossing E : 1000 mg  $(NH_4)_2S_2O_8$ /100 ml  $H_2O$

In een maatcilinder werd bij elkaar gevoegd resp:

4 ml oplossing A, 8 ml oplossing C, 4 ml oplossing D en 11,5 gram ureum. De oplossing werd aangevuld tot 29,5 ml en ontluicht, waarna 2,5 ml vers bereide oplossing E toegevoegd werd. Polymerisatie vond plaats bij kamertemperatuur. De elektroforese werd uitgevoerd bij 200 V en 5 mA per gel. Na afloop werden de gels met een injectienaald losgemaakt en in amidozwart gekleurd. Ontkleuring vond plaats in 2% azijnzuur.

## II.2.2. Resultaten en discussie

### Chromatografische scheiding van "zink- $\alpha$ -crystalline" op Sephadex G200

Het elutie-profiel van een scheiding is weergegeven in fig. 2. Hieruit blijkt dat het percentage verontreiniging met de andere crystallines ten hoogste 10% bedraagt. De K 100/100 kolom blijkt minder geschikt te zijn voor fijnere scheidingen. Dit type kolom is ons inziens alleen geschikt om fracties te scheiden die qua moleculairgewicht veel van elkaar verschillen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de grotere diffusie die in de kolom met zijn grote diameter optreedt.

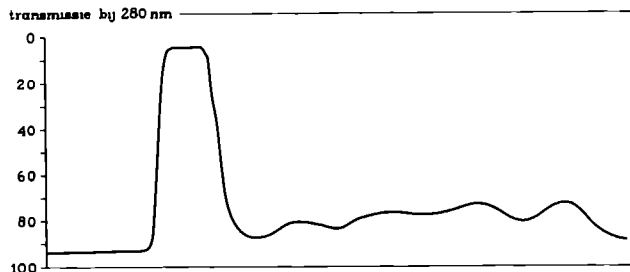


Fig. 2 Gelchromatografie van "Zn- $\alpha$ -crystalline" op Sephadex G200

#### Berekening van de opbrengst

Uitgaande van 20 g droog lensextrakt werd ongeveer 6 g "zink- $\alpha$ -crystalline" verkregen. Na zuivering over Sephadex G200 bleef na "poolen" ongeveer 5 g zuiver  $\alpha$ -crystalline over.

#### Onderzoek van de verschillende zuiveringsstappen m.b.v. de ultracentrifuge

De invloed van alle precipitatiestappen werd d.m.v. sedimentatiesnelheidsexperimenten bepaald.

Het patroon van een  $\alpha$ -crystalline-preparaat verkregen door isoëlektrische precipitatie uit totaal lensextrakt, is weergegeven in fig. 3a.

Het resultaat na de gecombineerde  $\text{Zn}^{2+}$ -alkohol en de isoëlektrische precipitatie, wordt geïllustreerd in fig. 3b, terwijl uit fig. 3c het effect van de gelfiltratie-stap blijkt, nl. een symmetrische piek, vrij van eiwitten van lager moleculairgewicht.



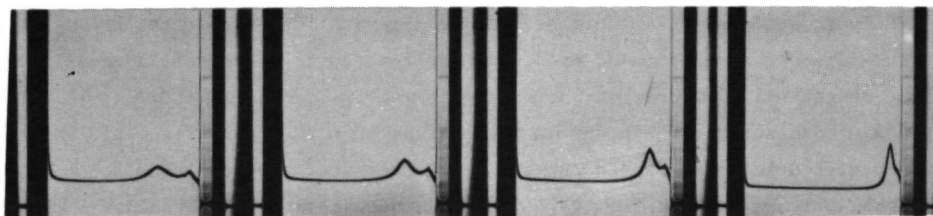
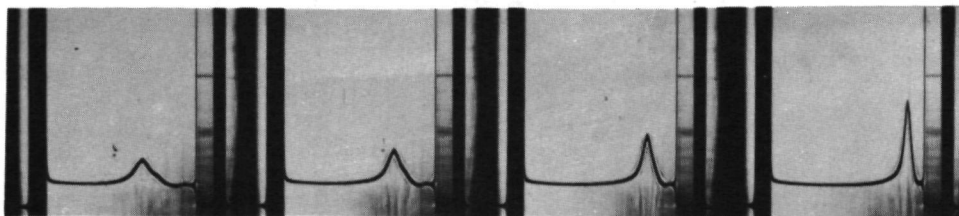
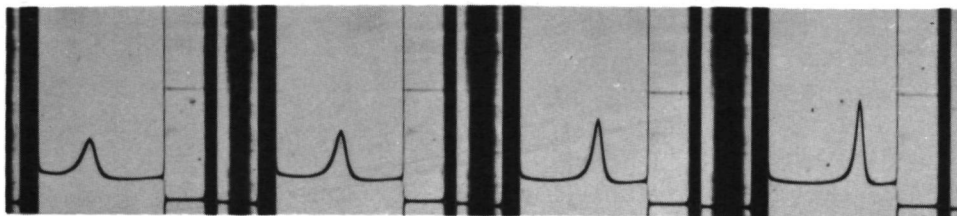


Fig. 3 Ultracentrifuge-patronen van  
a)  $\alpha$ -crystalline verkregen door isoelektrische precipitatie uit  
totaal lensextrakt.



b)  $\alpha$ -crystalline verkregen door gecombineerde  $\text{Zn}^{2+}$ -alkohol-isoelek-  
trische precipitatie.



c)  $\alpha$ -crystalline verkregen door gecombineerde Zn-alkohol-isoelek-  
trische precipitatie gevolgd door Sephadex G200 chromatografie.

## Polyacrylamidegel-elektroforese

Polyacrylamidegel-elektroforese van de  $\alpha$ -crystalline preparaten in basisch milieu leverde een band op die aan de top van de gel bleef;  $\alpha$ -crystalline dringt nl. niet door de poriën van de gel bij de gebruikelijke acrylamide concentratie. Wanneer de elektroforese in 7M ureum uitgevoerd wordt ziet men vier duidelijke banden terwijl een aantal veel zwakkere banden eveneens zichtbaar is (zie fig. 4). Op dit verschijnsel zal later nader worden ingegaan (hoofdstuk III).

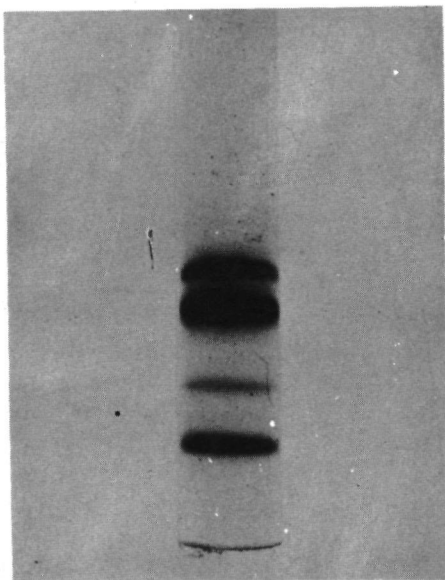


Fig. 4 Polyacrylamidegel-elektroforese van  $\alpha$ -crystalline bij pH 8,9 in 7M ureum. Het voltage bedroeg 200 V en het amperage 40 mA. De elektroforese werd uitgevoerd gedurende 90 minuten.

## II.3. ISOLERING VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE DOOR MIDDEL VAN CONTINUE VRIJE ELEKTROFORESE

### II.3.1. Materialen en methoden

#### Bereiding van de lenseiwitten

De in water oplosbare kalflenseiwitten werden bereid zoals eerder beschreven door Bloemendal en Ten Cate (1959).

#### De elektroforetische scheiding

Voor de scheiding van de wateroplosbare lenseiwitten werd het apparaat voor continue vrije elektroforese model Elphor volgens Hannig (1964), gefabriceerd door Bender en Holbein, München, gebruikt (zie fig. 5).

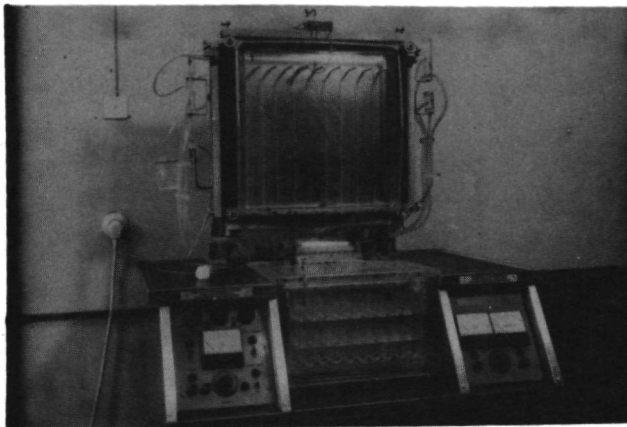


Fig. 5 Apparaat voor continue vrije elektroforese type Elphor. De cathode bevindt zich aan de rechter kant, de anode aan de linker kant van de kamer. De eiwitoplossing werd rechts boven ingebracht (zie pijl) met een snelheid van 2 ml/uur. Het voltage was 2900 V, het amperage 80 mA, de temperatuur werd op 4°C gehouden d.m.v. Peltier elementen. De snelheid van de bufferfilm was 50 cm per uur.

De bufferkamers werden gevuld met een oplossing bevattende 29,1 g Tris/liter. De pH van de oplossing werd met geconcentreerd HCl op 8,5 gebracht. De scheidingskamer werd gevuld met de bovengenoemde buffer, die tevoren 9 maal verdund werd. Het voltage was 2900 V, het amperage 80 mA, de temperatuur werd op 4°C gehouden. Per uur kon twee tot vier ml van een 5%-ige eiwitoplossing ingepompt worden. De snelheid van de bufferfilm was 50 cm/uur. De fracties werden doorgemeten bij 280 nm in een Beckman DB spectrofotometer.

#### Analyse m.b.v. de analytische ultracentrifuge

Sedimentatie-experimenten werden uitgevoerd in een Beckman-Spinco analytische ultracentrifuge model E. Er werd gebruik gemaakt van zowel Schlieren als van U.V. optiek, voorzien van een automatische scanner zoals beschreven door van Es en Bont (1967). Als oplosmiddel werd 0,02M fosfaatbuffer, pH 7,6 in 0,9% NaCl gebruikt.

#### Bepaling van leucineaminopeptidase-activiteit

Leucineaminopeptidase (LAP)-activiteit werd bepaald gebruikmakend van de incubatie-omstandigheden zoals beschreven door Hanson, Glässer en Kirche (1965) en de kleuringsreactie volgens Bernt en Bergmeyer (1963). Monsters van 0,2 ml werden gepreïncubeerd met 0,1 ml 0,01M  $\text{MnCl}_2$  en 0,1 ml 0,25M Tris HCl, pH 8,0, gedurende 80 minuten bij 37°C. Vervolgens werd 0,1 ml 0,0125M leucyl- $\beta$ -naftylamine toegevoegd. Na 1 uur werd de reactie gestopt met 0,5 ml 0,6M  $\text{HClO}_4$  en 1 ml van een vers bereide oplossing, bevattende 10 mg Echtrot 36L per 10 ml water, toegevoegd. Na 10 minuten staan bij kamertemperatuur werd 5 ml ethylacetaat toegevoegd. De buizen werden geschud op een Vortex-mixer, daarna gecentrifugeerd bij 4.000 rpm en doorgemeten bij 505 nm.

#### Scheiding van $\alpha$ -crystalline van leucineaminopeptidase

Vijftig mg  $\alpha$ -crystalline, opgelost in 0,1M Tris HCl, pH 8,0, werd op een Sepharose 6B kolom (3 x 70 cm) gechromatografeerd. De loopsnelheid was 10 ml/uur.

### II.3.2 Resultaten en discussie

Het resultaat van de scheiding van de wateroplosbare lenseiwitten is weergegeven in fig. 6.

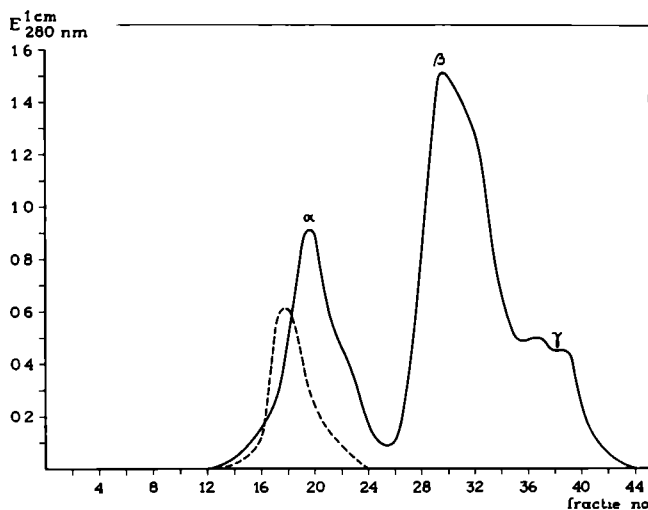


Fig. 6 Scheiding van  $\alpha$ -crystalline van de andere in water oplosbare lenseiwitten d.m.v. continue vrije elektroforese.

De gestippelde lijn geeft de localisatie van de leucineaminopeptidase-activiteit weer.

Het voltage bedroeg 2900 V, het amperage 80 mA en de temperatuur 4°C. De snelheid van de bufferfilm was 50 cm per uur. De eiwitoplossing werd rechts boven ingebracht met een snelheid van 2 ml per uur. (zie pijl in fig. 5).

Polyacrylamidegel-elektroforese van de eerste piek in 6M ureum pH 8,9 en vergelijking met de patronen van bekende monsters, rechtvaardigt de conclusie dat de snellopende component identiek is met  $\alpha$ -crystalline, terwijl de twee andere overeenkomen met  $\beta$ - en  $\gamma$ -crystalline. De  $\alpha$ -crystalline piek werd verder onderzocht in de ultracentrifuge. Met zowel Schlieren als U.V. optiek werd een symmetrische piek gevonden met een sedimentatie-constante  $S_{20} = 19,0S$ . (De Groot et al 1970).

Met de geschetste methode kan ongeveer 1 g  $\alpha$ -crystalline per 24 uur geïsoleerd worden. Aangezien deze isolatie continu plaatsvindt heeft deze methode voordelen boven alle andere tot nu toe beschreven bereidingswijzen. De opbrengst is kwantitatief.

De aanwezigheid van LAP in de ooglens is door Glässer en Hanson (1962) en door Spector (1963) aangetoond. LAP blijkt in alkalisch milieu ongeveer dezelfde elektroforetische mobiliteit te hebben als  $\alpha$ -crystalline. De activiteitspiek valt vrijwel samen met de  $\alpha$ -crystalline piek (zie fig. 6). In die gevallen waarbij LAP-vrije preparaten vereist worden, kan  $\alpha$ -crystalline zeer zuiver verkregen worden na gelfiltratie op Sepharose 6B (zie fig. 7).

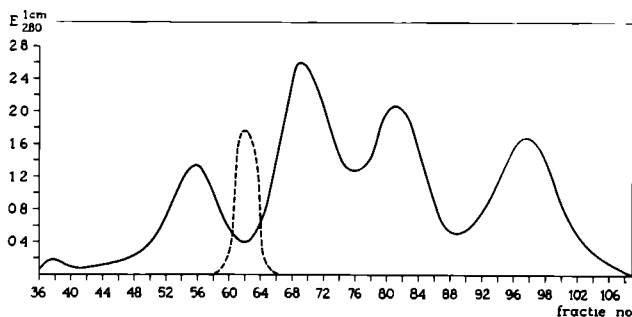


Fig. 7 Scheiding van de lenseiwitten op Sepharose 6B. De gestippelde lijn geeft de localisatie van de leucineaminopeptidase-activiteit weer.

Kolomdimensies : 3 cm x 70 cm

Elutiesnelheid : 10 ml per uur.

Voor sequentie-onderzoek van  $\alpha$ -crystalline is de aanwezigheid van LAP van ondergeschikt belang, daar het N-terminale aminozuur geacetyleerd is, waardoor het eiwit niet kon worden aangetast. Bovendien worden de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline in aanwezigheid van ureum gescheiden en onder deze omstandigheden

gaat de proteolytische activiteit verloren. Een ander belangrijk punt in deze overweging is het feit dat LAP als proteïne in uiterst kleine concentratie aanwezig is. De aanwezigheid van LAP kon'dan ook alleen op grond van de activiteitstest worden vastgesteld.

### HOOFDSTUK III

#### ONDERZOEK NAAR DE POLYPEPTIDE-KETENS VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE

##### III.1. INLEIDING

Het is sinds enkele jaren bekend dat  $\alpha$ -crystalline een aggregaat van, door secundaire krachten aan elkaar gebonden, peptide-ketens is. Alpha-crystalline dissocieert in geconcentreerde ureum oplossingen tot subeenheden (Bloemendal et al 1962), (Bont et al 1962). Het aantal geobsorbeerde banden bij elektroforese varieert, afhankelijk van de gebruikte methode en condities waarbij het experiment uitgevoerd is, tussen de 2 en de 14 (Bloemendal et al 1962), (Björk 1964), (van Dam 1967).

Om het aantal verschillende polypeptide-ketens in een eiwit vast te stellen, kunnen verschillende criteria gebruikt worden die hieronder samengevat zijn.

1. Het aantal C en/of N-terminale aminozuren in het eiwit. Hierbij dient men zich te realiseren dat twee verschillende polypeptide-ketens hetzelfde C of N-terminale aminozuur kunnen hebben. Aan de andere kant behoeft het



N of C terminale aminozuur niet altijd voor de diverse eindgroepbepalingen toegankelijk te zijn.

2. Polyacrylamidegel-elektroforese bij verschillende pH's en onder variërende omstandigheden.
3. Chromatografie op ionenwisselaars.
4. Isoëlektrofocusering.
5. Dissociatieproeven in verschillende desaggregerende media gevolgd door polyacrylamidegel-elektroforese.
6. Specifieke afbraakprocedures. Het moleculairgewicht van de polypeptideketens en nauwkeurige aminozuur-analyses moeten bekend zijn om de correlatie tussen het aantal peptiden verkregen na afbraak en het oorspronkelijke aantal polypeptideketens te achterhalen.

## Materialen en methoden

### N-terminale aminozuur

Het N-terminale aminozuur van  $\alpha$ -crystalline werd bepaald door een pronase afbraak van ongemodificeerd  $\alpha$ -crystalline uit te voeren en het hierbij verkregen N-terminale peptide te isoleren en te identificeren (zie hoofdstuk V).

### C-terminale aminozuren

De C-terminale aminozuren van de subeenheden werden bepaald d.m.v. carboxypeptidase A die van te voren met DFP behandeld was. Als interne standaard werd arginine gebruikt. Monsters werden na 1, 3, 6, 18 en 30 uur genomen. Het eiwit werd neergeslagen met TCA (eindconcentratie 5%) waarna de bovenstaande vloeistof op de aminozuur-analysator geanalyseerd werd.

### Bereiding van carboxymethyl $\alpha$ -crystalline (C.M. $\alpha$ )

Om oxydatie van cysteïne te voorkomen werd  $\alpha$ -crystalline gecarboxymethyleerd. De procedure geschiedde zoals beschreven door Schoenmakers et al (1969).

Een gram  $\alpha$ -crystalline werd opgelost in 20 ml 0,2M Tris HCl buffer, pH 8,5 in 0,1 mM EDTA (oplossing A).

218 mg Na-monojoodazijnzuur werd opgelost in 10 ml 0,2M Tris HCl buffer pH 8,5 in 0,1 mM EDTA (oplossing B).

Oplossingen A en B werden bij elkaar gevoegd waarna 180 ml 0,2M Tris HCl buffer pH 8,5 in 0,1 mM EDTA en 7M ureum toegevoegd werd. Incubatie vond plaats gedurende één uur in het donker, waarna 1 ml mercaptoethanol toegevoegd werd om de overmaat monojoodazijnzuur te binden. De oplossing werd tegen 0,5% mierenzuur gedialyseerd en drooggevroren.

#### Chromatografische scheiding van $\alpha$ -crystalline in de subeenheden A en B

De scheiding werd uitgevoerd zoals beschreven door Schoenmakers et al (1968) op een SE-Sephadex C50 kolom (3 x 40 cm). Lineaire gradient-elutie werd toegepast van 0,2M naar 0,4M natriumformiaat, pH 3,2, in 7M ureum. Beide buffervaten bevatten 500 ml buffer. De elutie-snelheid bedroeg 15 ml per uur. Fracties à 5 ml werden opgevangen en doorgemeten bij 280 nm. De scheiding van  $\alpha$ -crystalline in de subeenheden A en B werd ook uitgevoerd op DEAE Sephadex A25. Elutie van subeenheid B vond plaats met 0,01M fosfaatbuffer pH 6,5 in 7M ureum en 0,1% mercaptoethanol, waarna subeenheid A bij een hogere ionsterkte geëluëerd kan worden. Uit recente waarnemingen van dr. Hoenders in ons laboratorium, is gebleken dat carboxymethylering tot bijprodukten kon leiden; wij hebben daarom de carboxymethylering weggelaten en vervangen door behandeling met 0,1% mercaptoethanol. Scheiding van  $\alpha$ -crystalline in subeenheid A resp. B werd ook uitgevoerd op DEAE Sephadex A50 met fosfaatbuffer pH 7,5 in 7M ureum en 0,1% mercaptoethanol. Subeenheid B werd geëluëerd met 0,01M fosfaatbuffer. Subeenheid A kan vervolgens verkregen worden hetzij door de pH omlaag te brengen tot pH 5,8, hetzij door de concentratie op te voeren tot 0,06M.

#### Chromatografische scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens

De scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens werd op QAE Sephadex met 0,01M fosfaatbuffer pH 6,5 in 7M ureum en 0,1% mercaptoethanol uitgevoerd.

Scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens op een isoëlektrofocusering kolom

Voor de scheiding van subeenheid B in de polypeptide-ketens, werd gebruik gemaakt van een isoëlektrofocusering kolom. Deze methode is uitvoerig beschreven door Haglund (1967). De kolom werd gevuld met ampholine van pH 6 tot 8.

De cathode-vloeistof bevatte 9 g ureum, 15 g sucrose, 0,4 ml ethyleendiamine en water tot een eindvolume van 25 ml.

De anode-vloeistof bevatte 2,4 g ureum, 0,1 ml geconcentreerd zwavelzuur en water tot een volume van 10 ml.

Het gradient werd gevormd door een oplossing van lage dichtheid bevattende 18 g ureum, 3 ml 10% ampholine oplossing en water tot een eindvolume van 50 ml en een oplossing van hoge dichtheid bevattende 18 g ureum, 24 g sucrose, 9 ml 10% ampholine, 0,9 ml mercaptoethanol aangevuld met water tot een eindvolume van 50 ml. De verschillende vloeistoffen werden toegevoegd d.m.v. een peristaltische pomp. Door de spanning te regelen werd ervoor gezorgd dat het vermogen beneden de 2 Watt bleef. De duur van het experiment was 2 à 3 dagen.

Scheiding van subeenheid A in de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$

De scheiding van subeenheid A in de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  geschiedde m.b.v. SE-Sephadex chromatografie volgens Schoenmakers et al (1969). Elutie vond plaats met natrium-acetaat buffer pH 5,5 m.b.v. een lineaire gradient van 0,07M naar 0,17M natrium-acetaat, pH 5,5 in 7M ureum. Beide vaten bevatten 500 ml buffer.  $A_1$  en  $A_2$  konden ook verkregen worden door DEAE A50 chromatografie met 0,06M fosfaatbuffer pH 7,5 in 7M ureum. Volgens deze methode kon zowel  $B_1$  en  $B_2$  (met 0,01M fosfaatbuffer) als  $A_1$  en  $A_2$  uit dezelfde kolom geëluëerd worden.

#### Aminozuur-analyses

De polypeptide-ketens werden in 6N HCl gedurende 22 uur bij 110°C gehydrolyseerd. De aminozuursamenstelling werd bepaald volgens Gerding (1970). Het ammoniakgehalte van subeenheid A werd bepaald na hydrolyse gedurende resp. 12, 24, 48 en 72 uur door extrapolatie naar  $t = 0$ .

#### Resultaten en discussie

##### N-terminale aminozuur

N-acetyl methionine werd als enige N-terminale aminozuur gevonden (zie hoofdstuk V en Corran en Waley 1970).

## C-terminale aminozuren

Schoenmakers et al (1969) vonden 1 mol serine per 21.500 g subeenheid A. Bloemendal (1969) vermeldde dat lysine het C-terminale aminozuur van subeenheid B was. Wij bepaalden dit aminozuur kwantitatief en vonden 1 mol lysine per 30.000 g subeenheid B. De gevonden hoeveelheid serine nl. 1 op 21.500 g subeenheid A en lysine 1 op 30.000 g subeenheid B zijn niet in overeenstemming met de recent gevonden waarden voor het molecuulairgewicht van de subeenheden. Een mogelijke verklaring is dat serine door carboxypeptidase moeilijk afsplitsbaar was. De afsplitsing van lysine door carboxypeptidase A geschiedt uiterst langzaam. Dit aminozuur wordt door carboxypeptidase B sneller afgesplitst. Dit instabiele enzyme was echter in actieve vorm in Nederland niet verkrijgbaar.

## Scheiding van $\alpha$ -crystalline in subeenheden

De scheiding van  $\alpha$ -crystalline in subeenheid A (acidic), zo genoemd wegens zijn "zure" karakter, resp. subeenheid B (basic), zo genoemd wegens zijn meer basische karakter, door SE-Sephadex chromatografie is in fig. 8 weergegeven.

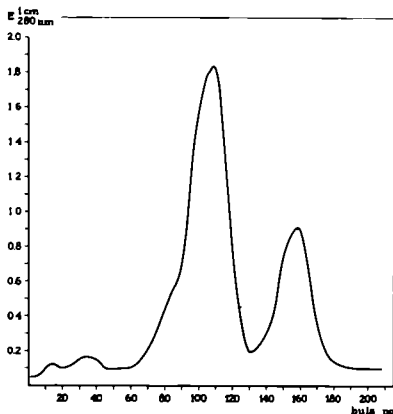


Fig. 8 Scheiding van  $\alpha$ -crystalline op een SE-Sephadex kolom (3 x 40 cm). Lineaire gradient-elutie werd toegepast van 0,2M naar 0,4M natriumformiaat; pH 3,2, in 7M ureum. Fracties van 5 ml werden opgevangen.

De scheiding van  $\alpha$ -crystalline in polypeptide-ketens d.m.v. DEAE Sephadex A50 chromatografie is geïllustreerd in fig. 9.

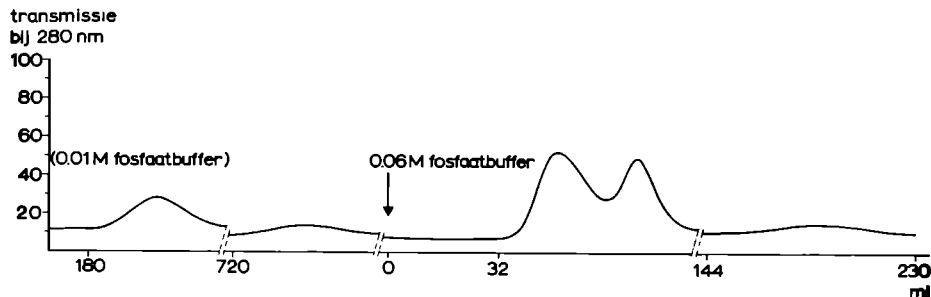


Fig. 9 Scheiding van de polypeptide-ketens van  $\alpha$ -crystalline d.m.v. chromatografie op DEAE Sephadex. Elutie van de B-ketens vond plaats met 0,01M fosfaatbuffer pH 7,5 in 7M ureum en 0,1% mercaptoethanol, terwijl de A-ketens met 0,06M fosfaatbuffer geëluëerd werden.

Kolomdimensies : 2,5 x 40 cm.

Fracties van 5 ml werden opgevangen.

De isolatie van subeenheid B werd ook uitgevoerd op DEAE Sephadex A25 (zie fig. 10). Deze ionenwisselaar bleek een zeer goede doorstroomsnelheid te hebben.

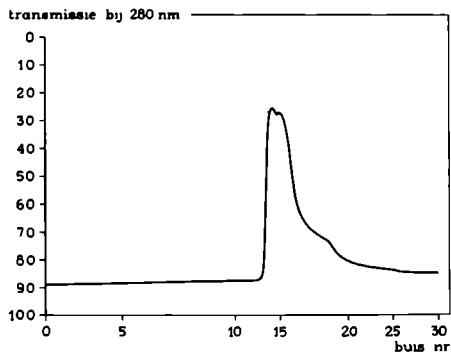


Fig. 10 Isolatie van subeenheid B d.m.v. DEAE Sephadex A25 chromatografie. De elutie vond plaats met 0,01M fosfaatbuffer pH 6,5 in 7M ureum.

Het profiel toont duidelijk de tendentie van subeenheid B aan om op te splitsen.

#### Scheiding van de polypeptide-ketens van de subeenheden A en B

De scheiding op SE-Sephadex van de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  is in fig. 11 weergegeven.

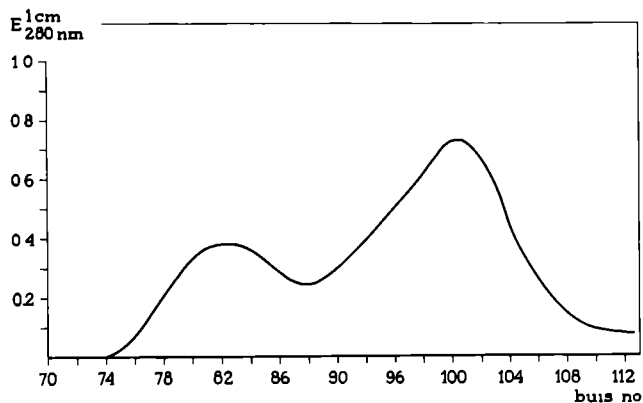


Fig. 11 Scheiding van subeenheid A in de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  d.m.v. SE-Sephadex chromatografie. Lineaire gradient-elutie werd toegepast van 0,07M naar 0,17M natrium acetaat buffer, pH 5,5 in 7M ureum. Kolomdimensies : 3 x 40 cm. Fracties van 5 ml werden opgevangen.

De scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens m.b.v. QAE Sephadex chromatografie is aangegeven in fig. 12.

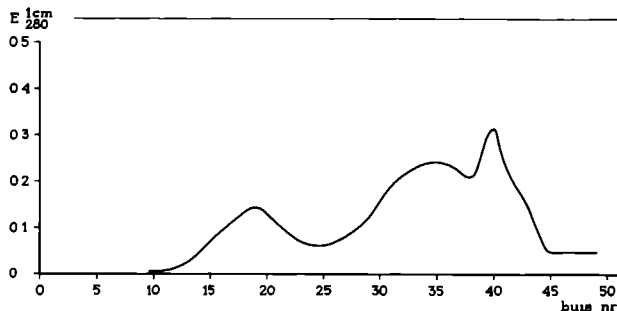


Fig. 12 Scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens m.b.v. QAE Sephadex chromatografie. Elutie vond plaats met 0,01M fosfaatbuffer pH 6,5 in 7M ureum.

Kolomdimensies : 3 x 40 cm.

Fracties van 5 ml werden opgevangen.

De scheiding van subeenheid B d.m.v. isoëlektrofocusering leverde drie fracties op met de volgende isoëlektrische punten: 6, 8, 7,2 en 7,6 (zie fig. 13).

#### Polyacrylamidegel-elektroforese

Subeenheid A verkregen door SE-Sephadex chromatografie leverde twee banden op. Terwijl subeenheid B twee hoofdbanden en een zwakke tussenband opleverde (zie fig. 14).

Subeenheid B verkregen door DEAE A25 chromatografie leverde slechts twee scherpe banden op (zie fig. 15).

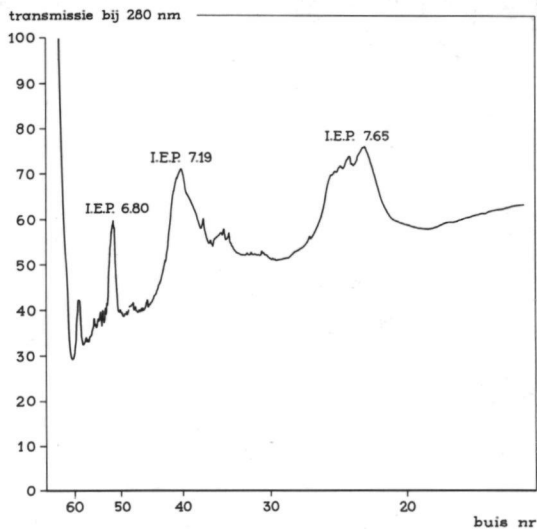


Fig. 13 Scheiding van subeenheid B in polypeptide-ketens op een elektro-isofocuseringskolom bij 25°C. Ampholine bereik pH 6 tot 8.

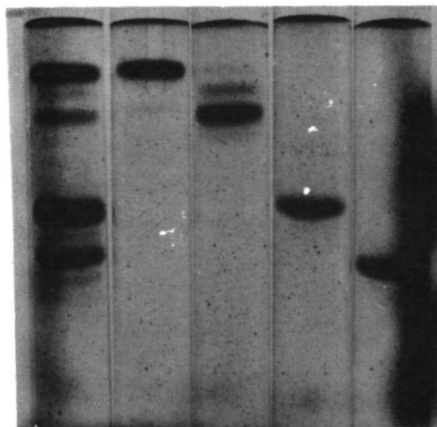


Fig. 14 Polyacrylamidegel-elektroforese van, van links naar rechts,  $\alpha$ -cristalline, de polypeptide-ketens  $A_1$  resp.  $A_2$ ,  $B_1$  resp.  $B_2$  bij pH 8,9 in 7M ureum. De elektroforese werd gedurende anderhalf uur uitgevoerd. Het voltage bedroeg 200V en het amperage 40mA.



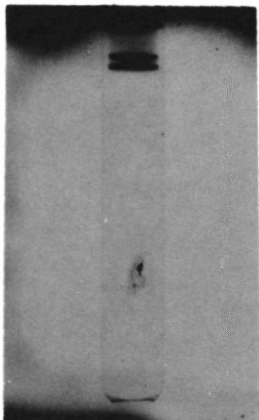


Fig. 15 Polyacrylamidegel-elektroforese van subeenheid B bereid m.b.v. DEAE Sephadex chromatografie. De elektroforese werd gedurende 60 minuten uitgevoerd bij pH 8,9 in 7M ureum. Het voltage bedroeg 200 V en het amperage 40mA.

#### Aminozuur-analyses

Aminozuur-analyses van de subeenheden A en B en van de polypeptide-ketens zijn weergegeven in tabel I.

De subeenheden A en B vertonen overeenkomsten wat betreft het gehalte aan Glu, Met, Ile, Leu, terwijl het gehalte aan Ser, Pro en Tyr duidelijk verschillend is. Het meest opvallende is het ontbreken van Cys in subeenheid B.

De aminozuur-analyses van de polypeptide-ketens A<sub>1</sub> en A<sub>2</sub> zijn identiek aan elkaar. Aminozuur-analyses van de verschillende B fracties verkregen m.b.v. isoëlektrofocusering waren op het aminozuur alanine na binnen de foutengrens identiek.

Het totale ammoniak-gehalte in subeenheid A bedroeg 7 mol ammoniak.

TABEL I

Aminozuur-analyses van de polypeptide-ketens van  $\alpha$ -crystalline

Aminozuur	Polypeptide-ketens						
	A***	A <sub>1</sub> **	A <sub>2</sub> **	B***	B <sub>1</sub> †	B <sub>2</sub> †	B <sub>3</sub> †
Asp	10,2	9,6	9,8	8,0	7,6	7,8	8,1
Thr	3,0	2,6	2,7	4,0	3,5	3,8	3,6
Ser	14,2	14,7	14,9	10,2	9,3	9,5	9,6
Glu	11,1	10,6	11,0	10,7	9,6	9,7	10,3
Pro	6,9	7,0	7,2	10,6	9,5	10,1	8,9
Gly	6,3	5,8	6,1	5,0	5,6	5,2	5,6
Ala	3,7	3,5	3,7	5,3	5,9	4,9	4,3
Val	5,8	5,8	6,0	5,4	5,6	6,1	5,8
Met	0,56	1,0	1,0	0,8	0,7	0,3	0,4
Ile	4,9	5,0	4,9	4,7	5,3	5,0	5,1
Leu	8,5	8,0	8,3	8,7	8,4	8,3	8,3
Tyr	3,3	3,4	3,3	1,1	0,7	1,1	1,0
Phe	8,8	8,2	8,3	7,5	6,7	7,1	6,9
Lys	4,1	4,2	4,2	5,6	6,7	5,5	5,7
His	4,0	4,0	4,0	4,7	5,7	5,9	6,2
Arg	7,9	7,8	8,0	7,7	9,0	9,8	10,0
Cys*	††	1,0	1,1	0	0	0	0
Try*	1,0	1,0	1,1	††	††	††	††

\* : cysteïne werd als cysteïnezuur bepaald en tryptofaan werd volgens Bencze en Schmid (1957) bepaald.

\*\* : bereid door chromatografie op SE Sephadex

\*\*\* : bereid door chromatografie op DEAE Sephadex

† : fracties geïsoleerd d.m.v. isofocussing

†† : niet bepaald

## Peptide-kaarten

Van de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  werden peptide-kaarten aangelegd. Deze waren op één vlek na identiek aan elkaar (zie tevens hoofdstuk VI), hetgeen de verregaande overeenkomsten in de aminozuur-analyses bevestigt (zie fig. 16 en fig. 17).

Subeenheid B leverde een veertiental duidelijke vlekken op. Het is daarom onwaarschijnlijk dat, mede in verband met de aminozuursamenstelling der diverse B fracties, subeenheid B uit meer dan twee verschillende ketens zou bestaan.

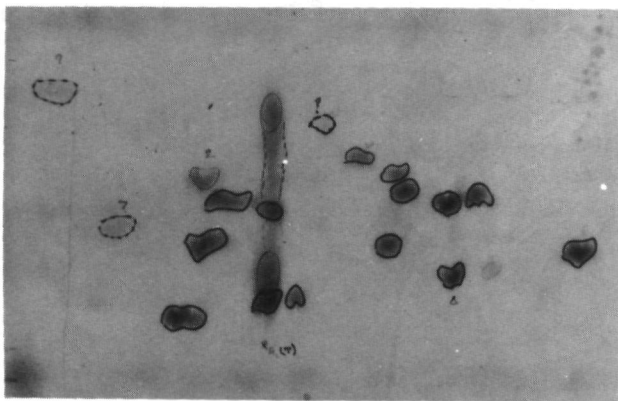
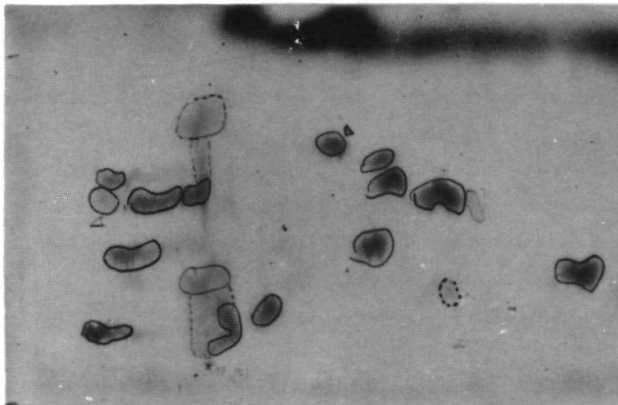
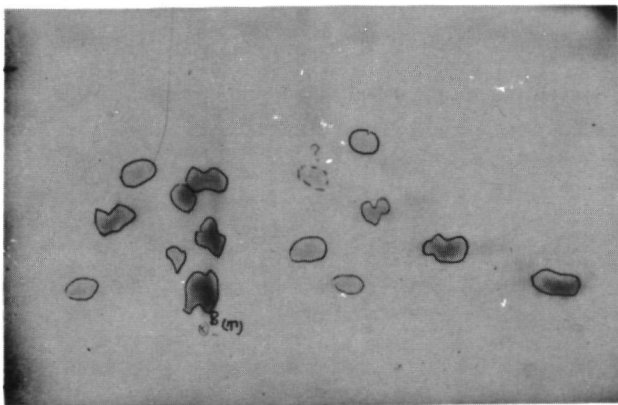


Fig. 16 Peptide-kaart van polypeptide-keten  $A_1$ .

Elektroforese werd uitgevoerd in horizontale richting bij 4000V en 60mA bij pH 6,4 gedurende 90 minuten. Chromatografie werd uitgevoerd in vertikale richting met als loopmiddel een mengsel van butanol, pyridine, azijnzuur en water in de verhouding 75: 50: 16: 60.



**Fig. 17** Peptide-kaart van polypeptide-keten  $A_2$ .  
De omstandigheden zijn dezelfde als in fig. 16 vermeld.



**Fig. 18** Peptide-kaart van subeenheid B.  
De omstandigheden zijn dezelfde als in fig. 16 vermeld.

Wat kunnen wij nu uit al deze resultaten concluderen?

Alpha-crystalline bestaat uit twee verschillende subeenheden. Subeenheid A bestaat uit twee polypeptide-ketens met gelijke aminozuur-samenstelling. De polypeptide-ketens vertonen verschillende mobiliteiten na polyacrylamidege--elektroforese bij pH 8,9. De geïsoleerde ketens blijken op één peptide na, gelijke peptide-kaarten te hebben.

Subeenheid B kon zowel d.m.v. chromatografie op QAE als op DEAE Sephadex in twee fracties gescheiden worden. Op de isoëlektrofocusering kolom kon een scheiding in drie fracties verkregen worden, die op het aminozuur alanine na, identieke aminozuursamenstelling hadden.

Polyacrylamidegel-elektroforese van subeenheid B vertoonde twee soms drie banden terwijl de peptide-kaarten van subeenheid B een veertiental tryptische peptiden vertoonden. Het exakte aantal verschillende polypeptide-ketens in subeenheid B is nog niet geheel duidelijk. Het optreden van drie fracties bij isofocusering en op polyacrylamidegels zou een gevolg kunnen zijn van onvolledige dissociatie. In hoofdstuk IV zal blijken hoe weinig efficiënt ureum als desaggregerend medium kan zijn. Isofocusering in 2% SDS blijkt onoverkomelijke bezwaren te hebben wegens de te grote geleiding die hierbij optreedt.

Analyse van geïsoleerde peptiden van de verschillende fracties van subeenheid B en de opheldering van de primaire structuur ervan, lijken op dit moment de meest aangewezen weg om kleine verschillen aan te tonen.

Zeer nauwkeurige titraties van de geïsoleerde fracties en/of ammoniak-bepalingen door aminozuur-analyses zouden nuttige informatie over eventuele verschillen in de verhouding glutaminezuur glutamine of asparaginezuur asparagine, kunnen verschaffen.

## HOOFDSTUK IV

### MOLECULAIRGEWICHTSBEPALING VAN DE SUBEENHEDEN VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE

#### IV.1. MOLECULAIRGEWICHTSBEPALINGEN VOLGENS DE METHODE VAN ARCHIBALD

##### IV.1.1. Inleiding

Reeds eerder werd vermeld dat  $\alpha$ -crystalline uit subeenheden bestaat (Bloemendal et al 1962, Bont et al 1962). Het moleculairgewicht van de subeenheden werd door verschillende onderzoekers bepaald. De gevonden waarden variëren tussen 18.000 en 50.000 (Bont et al 1962, Bloemendal et al 1962, Björk 1964, Spector et al 1965, Wisse et al 1966, Shapiro 1968). Deze waarden werden bepaald in ureum, SDS en guanidine HCl. In ons laboratorium werd vastgesteld dat bij langere incubatietijd het moleculairgewicht belangrijk lager dan 20.000 is (Hoenders et al 1969, De Groot et al 1970). Tevens werd de mogelijkheid van het ontstaan van een breuk door kwantitatieve eindgroepbepalingen onwaarschijnlijk gemaakt.

#### IV.1.2. Materialen en methoden

##### Uitgangsmateriaal

Uitgegaan werd van CM- $\alpha$ -crystalline. De subeenheden en de polypeptideketens werden geïsoleerd zoals beschreven in hoofdstuk III.

##### Moleculairgewichtsbepalingen

Het moleculairgewicht werd bepaald volgens Archibald m.b.v. absorptie-optiek zoals beschreven door de Groot et al (1969). De polypeptideketens werden in ureum, natrium-dodecylsulfaat of guanidine-HCl, geïncubeerd en het moleculairgewicht in afhankelijkheid van de incubatietijd gemeten. Om het moleculairgewicht exakt te kunnen bepalen is het noodzakelijk om de mate van SDS-adsorptie aan het eiwit te kennen. Hiertoe werden  $\alpha$ -crystalline monsters opgelost in 2% SDS en gedurende een week tegen een 1000-voudige hoeveelheid buffer gedialyseerd. De eiwitconcentratie werd hierna bepaald bij 280nm, waarbij voor de extinctie van een 0,1% oplossing 0,82 werd aangenomen. Het brekingsindexincrement  $\Delta n$  voor 1% eiwitoplossing bedraagt 0,0019, terwijl  $\Delta n = 0,0016$  voor 1% SDS bedraagt. De hoeveelheid aan eiwit gebonden SDS werd verkregen uit 4 bepalingen, waarbij de eiwitconcentraties van 3 tot 10 mg/ml varieerde. Het partiële specifieke volume  $\bar{V}$  werd berekend door lineaire interpolatie van de normale waarde voor  $\alpha$ -crystalline (0,74) en de  $\bar{V}$  van SDS (0,885).

##### Eindgroepbepalingen

###### a. De dansylmethode volgens Gray (1967)

Vijfentwintig mg subeenheid A resp. subeenheid B werd opgelost in 1 ml 2% SDS of in 1 ml 7M ureum. Na 3 dagen staan werd 1 ml 0,5M NaHCO<sub>3</sub> en 0,5 ml dansylchloride oplossing (20 mg/ml aceton) toegevoegd. Na enkele uren staan bij 37°C werd het eiwit met aceton neergeslagen en afgedraaid, gedroogd en in 0,5 ml 6N HCl gedurende 18 uur bij 105°C gehydrolyseerd. Na drogen in

vacuo boven NaOH, werden de monsters opgenomen in een aceton-azijnzuur mengsel (3:2 v/v) en op polyamide platen twee-dimensionaal gechromatografeerd met als loopmiddelen: benzeen-azijnzuur (9:1 v/v) en water-mierenzuur 90% (100:1,5 v/v). Tevens werd een een-dimensionale chromatografische bepaling op silicagel dunnelaag-platen uitgevoerd met als loopmiddel benzeen-pyridine-ijsazijn (80:20:2 v/v).

b. De DNFB methode volgens Sanger (1951)

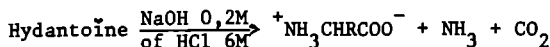
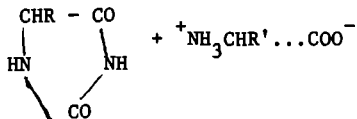
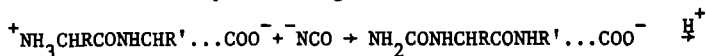
Vierhonderd mg DNFB werden toegevoegd aan 40 mg subeenheid A resp. subeenheid B, opgelost in 2% SDS. De reactie vond in het donker plaats gedurende 8 uur bij pH 8 in een pH-staat (Radiometer Copenhagen). Na afloop van de reactie werd de oplossing met ether gewassen. De waterige oplossing werd op pH 3 gebracht, waarbij het peptide neersloeg. Aceton werd nog toegevoegd om de precipitatie zo volledig mogelijk te laten verlopen. Het neerslag werd met ether gewassen, vervolgens met ethylacetaat, aceton en tenslotte ether. Ether- en water-fracties werden *in vacuo* ingedampt. De ether-fractie werd op papier gebracht en gechromatografeerd met als loopvloeistoffen in de eerste richting tolueen-chloormethanol-pyridine (30:18:9 v/v) verzadigd met ammonia en in de tweede richting 1,5M fosfaat-buffer pH 6,1 (Levy 1954). De water-fractie werd gechromatografeerd met het loopmiddel-systeem van Blackburn & Lowther (1951). Het papier werd gedompeld in ftalaatbuffer pH 6. Ontwikkeling vond plaats met tert. amyl-alkohol verzadigd met bovenstaande buffer.

c. De cyanaatmethode volgens Stark (1963)

De aminogroep van eiwitten kan volledig gecarbamyleerd worden d.m.v. KNCO. Door verhitten in zuur milieu wordt het hydantoïne van het N-eindstandig aminozuur gevormd. Dit hydantoïne kan geïsoleerd worden en na hydrolyse als aminozuur kwantitatief bepaald worden.



De reactie verloopt als volgt:



#### Bereiding van de carbamyl-verbinding van gecarboxymethyleerd $\alpha$ -crystalline

Twee ml vers gedistilleerd N-ethyl morpholine werd gemengd met 2 ml water; de pH werd op 8 gebracht met ijsazijn. In bovenstaande buffer werd 2,4 g ureum opgelost tot een volume van 5 ml. Vijftig mg  $\alpha$ -crystalline werd opgelost in 1 ml 8M ureum. Aan deze oplossing werd 1 ml van de buffer en 100 mg KNCO toegevoegd. De carbamyleringsreactie werd bij 50° gedurende één nacht uitgevoerd. De oplossing werd vervolgens aangezuurd met azijnzuur tot pH 3 en het eiwit met aceton neergeslagen. Het precipitaat werd gedroogd in de exsicator boven NaOH - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Bij de bereiding van het carbamyl-eiwit zijn verliezen onvermijdelijk. Het is dus noodzakelijk de berekeningen op de hoeveelheid carbamyl-eiwit die d.m.v. aminozuur-analyse te bepalen is, te baseren.

#### Cyclisatie tot het hydantoïne

Het eiwit werd opgelost in 1 ml 50% azijnzuur, vervolgens werd 1 ml 12N HCl toegevoegd. 0,1 ml werd bewaard voor aminozuur-analyse om de opbrengst aan carbamyl-eiwit te bepalen. De hydrolyse-buizen werden ontlucht. De buizen bestemd voor de aminozuur-analyse werden bij 110° gedurende 22 uur gehydrolyseerd, terwijl het hydantoïne in 1 uur bij 100° werd gevormd. Het hydrolysaat, bevattende de hydantoïnes, werd aan de rotatieverdamper gedroogd en opgenomen in 1 ml water.

## Isolering van de hydantoïnes

De oplossing werd op een Dowex 50-X2 (10 x 0,9 cm) kolom in de  $H^+$ -vorm gebracht. In het water-eluaat ( $\pm$  70 ml) bevinden zich, voor zover aanwezig, de hydantoïnes van alle neutrale en zure aminozuren en homocitrulline. Het eluaat (fractie A) werd gedroogd aan de rotatieverdamer. De kolom werd vervolgens gewassen met 40 ml 1M  $NH_4OH$ ; in dit eluaat bevinden zich de hydantoïnes van histidine en arginine, vrije aminozuren en peptiden. Het water-eluaat werd drooggedampt, opgenomen in 5 ml 3M HCl en 30 min. op  $100^\circ C$  verhit om pyrrolidon-carboxylpeptiden en pyrrolidon-carbonzuur te hydrolyseren. Het hydrolysaat werd drooggedampt, opgenomen in 2 ml water en op een Dowex 50-X2 kolom (5 x 0,4 cm) gebracht. Het water-eluaat ( $\pm$  6 ml) werd drooggedampt. Het ammoniak-eluaat (fractie B) werd drooggedampt, opgenomen in 1 ml water en op een Dowex 50-X2 kolom (10 x 0,9 cm) opgebracht. Elutie vond plaats met 0,8M HCl. In de eerste 70 ml bevinden zich indien aanwezig de hydantoïnes van histidine en arginine. Vrij histidine en vrij arginine worden pas na  $\pm$  180 ml geëluëerd i.v.m. hun dubbel-positieve lading.

## Hydrolyse van hydantoïnes en bepaling van de vrijgekomen aminozuren

Fractie A werd 24 uur in 0,2M NaOH bij  $110^\circ$  gehydrolyseerd. Fractie B werd 96 uur in 6N HCl bij  $110^\circ$  gehydrolyseerd. Het is essentieel dat dit eluaat in zuur gehydrolyseerd wordt, daar uit arginine ornithine, en uit homocitrulline, afkomstig van neutrale peptiden die meegeëluëerd worden, lysine ontstaat indien de hydrolyse in basisch milieu uitgevoerd wordt.

### IV.1.3. Resultaten en discussie

In tabel II zijn de gevonden waarden voor het moleculairgewicht van de diverse fracties weergegeven. De tijdsafhankelijke dissociatie geeft een mogelijke verklaring voor de discrepanties voor de in de literatuur gevonden waarden voor de moleculairgewichten van de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline.

TABEL II  
Moleculairgewichtsbepaling van de polypeptide-ketens van  
 $\alpha$ -crystalline

Denatureringsagens*	Incubatielijd	Subeenheid		Polypeptide-ketens	
		A	B	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
U	3-6 uur	19.900	18.300	18.150	17.700
SDS	3-6 uur	16.800	16.200	12.600	14.800
U	3 dagen	21.300	17.100	11.800	11.000
SDS	3 dagen	12.000	14.000	11.600	12.400
U + G	3 dagen	16.400	16.100	14.000	14.000

\*U = ureum, SDS = natrium-dodecylsulfaat, G = guanidine-HCl.

Een adsorptie van  $0,19 \pm 0,09$  g SDS/g eiwit werd gevonden. Voor het partiële specifieke volume werd  $0,76$  berekend. Het moleculairgewicht bedraagt  $11.400 \pm 1200$  wanneer rekening gehouden wordt met de SDS adsorptie (de Groot et al 1970).

Een mogelijke verklaring voor de gevonden waarden voor het moleculairgewicht na 3 dagen incuberen in desaggregerende media was, dat er een breuk ontstaat in de polypeptide-ketens (Ansevin 1968, Charlwood et al 1970). Wanneer dit het geval zou zijn, dan zouden er nieuwe N-terminale aminozuren moeten ontstaan. Deze mogelijkheid werd onderzocht door gebruik te maken van diverse eindgroep-bepalingen.

#### De dansylmethode

Deze eindgroepbepaling leverde arginine als nieuwe eindgroep op. Deze methode is, hoewel zeer gevoelig, niet geschikt voor kwantitatieve bepalingen daar het eiwit onder de reactie omstandigheden neerslaat.

De DNFB koppeling leverde in de ether-fractie alleen sporen serine op terwijl in de water-fractie DNP arginine aangetoond kon worden d.m.v. de Sakaguchi reactie (Easley 1965). De DNP-arginine vlek was moeilijk te scheiden van  $\epsilon$ -DNP-lysine, van een betrouwbare kwantitatieve bepaling kan dus in dit geval geen sprake zijn. Te oordelen naar de intensiteit van de kleur kon de conclusie getrokken worden dat arginine in sporen aanwezig was, dit volgde nl. uit proeven waarbij oplopende concentraties van DNP-arginine werden

opgebracht en gekleurd. De DNFB koppeling in 2% SDS verloopt op zichzelf volledig. Door de  $\epsilon$ -DNP-lysine vlekken te elueren en de extinctie te meten werd bij een molaire extinctiecoëfficiënt voor het DNP-derivaat van 16.000, 4 mol.  $\epsilon$ -DNP-lysine per 12.000 g subeenheid A gevonden. Dit resultaat is in overeenstemming met het molpercentage lysine berekend uit de kwantitatieve aminozuur-analyse van subeenheid A.

#### De cyanaatmethode

Uit de kwantitatieve aminozuur-analyse bleek dat 37 mg carbamyl  $\alpha$ -crystalline werd verkregen uit 50 mg drooggevroren eiwit. Uit de aminozuur-analyse bleek verder dat 24% van de oorspronkelijk in  $\alpha$ -crystalline aanwezige lysine, teruggevonden werd. Lysine ontstaat nl. uit homocitrulline tijdens de hydrolyse. Wanneer meer dan 24% van de oorspronkelijke hoeveelheid teruggevonden zou worden, zou dit betekenen dat de carbamylering onvolledig verlopen was (Stark 1963). Het water-eluaat van de Dowex kolom (fractie A) bleek na hydrolyse zelfs geen spoor aminozuur te bevatten. Fractie B bleek arginine-hydantoïne te bevatten, daar na hydrolyse vrij arginine gevonden werd. Gevonden werd 120 nm arginine per 37 mg carbamyl  $\alpha$ -crystalline, hetgeen neerkomt op 1 mol. arginine per 24.000 g eiwit. De opbrengst aan arginine via deze eindgroepbepaling is volgens de literatuur 76%. Wij hebben in ons geval dezelfde correctiefactor toegepast.

#### Conclusie

De kwantitatieve eindgroepbepaling heeft de mogelijkheid van een breuk onwaarschijnlijk gemaakt. Het driemaal vinden van arginine in sporen, volgens verschillende methodieken zou wel op een zwakke plek t.o.v. ureum inwerking kunnen wijzen.

## IV.2. MOLECULAIRGEWICHTSBEPALING VAN DE POLYPEPTIDE-KETENS VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE VOLGENS DE METHODE VAN KATZ

### IV.2.1. Inleiding

Het gehalte aan elk van de aminozuren in een eiwit wordt door een constant geheel getal weergegeven. Het meest waarschijnlijke moleculairgewicht kan afgeleid worden uit de aminozuursamenstelling m.b.v. de numerieke kleinste kwadraatberekening, welke door Katz (1968) ontwikkeld is.

### IV.2.2. Materialen en methoden

#### Isolatieprocedure

Alpha-crystalline werd geïsoleerd, gecarboxymethyleerd en in subeenheden gescheiden zoals beschreven in hoofdstuk III. De zuiverheid van de verkregen subeenheden werd gecontroleerd door polyacrylamidegel-elektroforese bij pH 8,9 in 7M ureum (zie hoofdstuk III).

#### Aminozuur-analyses

De polypeptide-ketens werden in 6N HCl bij 110°C gedurende 22 uur gehydrolyseerd en geanalyseerd zoals uitvoerig beschreven is door Gerding (1970). De volgende correctiefactoren werden gebruikt:  
Thr 5%, Ser 10,6%, Val 4,6%, Ile 6,7%, Lys 0,6%.

#### Afbraak m.b.v. trypsine

Tien mg zout-vrije polypeptiden werden gesuspenderd in 1 ml 0,1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 0,2 mg TPCK trypsine werd toegevoegd. De chymotryptische activiteit van het trypsine preparaat werd bepaald m.b.v. tyrosylethylester volgens Schwert et al (1955). Incubatie vond plaats bij 37°C gedurende 18 uur.

## Hoogspanningselektroforese

Elektroforese werd op Whatman 3MM uitgevoerd m.b.v. een Savant hoogspanningsapparatuur bij 4000 V en 50 mA gedurende 90 minuten met als buffer pyridine, azijnzuur, water 200:8:2792 v/v, pH 6,4.

## Papierchromatografie

De elektroferogrammen werden gedurende 30 minuten bij 90° gedroogd waarna stijgende chromatografie in butanol, pyridine, azijnzuur en water (75:50:16:60) werd uitgevoerd. De peptiden werden gedetecteerd met het ninhydrine reagens.

## Moleculairgewichtsbepaling

Volgens de methode van Katz wordt het moleculairgewicht berekend door  $\sum (h_i f_i D_i(x))^2$  uit te zetten tegen X. Deze functie heeft een minimum. Dit minimum is het meest waarschijnlijke moleculairgewicht.

## Verklaring van de letters

$i$  stelt de  $i^{\text{e}}$  soort aminozuur voor.

$R_i$  is het aantal molen van aminozuur  $i$  per  $10^4$  g eiwit.

X is een variabele gelijk aan  $10^{-4}$  maal het arbitrair gekozen test-moleculairgewicht.

$D_i(x)$  is het verschil tussen de analytische samenstelling van het aminozuur  $i$  en het dichtsbijzijnde geheel getal voor het beschouwde test-moleculairgewicht.

$h_i$  is een maat voor de relatieve nauwkeurigheid waarmee  $R_i$  bepaald is.

$f_i$  kan de waarde 1 of  $1/R_i$  toegekend krijgen en stelt een functionele gewichtsfactor voor.

Het is niet gunstig voor  $f_i = 1/R_i$  te nemen in die gevallen waarbij eiwit-contaminaties aanwezig zijn. De waarde van de in kleine hoeveelheid aanwezige residueën wordt hierdoor namelijk meer beïnvloed dan de in grotere hoeveelheid aanwezige aminozuren, dit uiteraard procentueel gezien.

Hierbij en in die gevallen waarbij de in kleine hoeveelheid aanwezige aminozuren hetzij labiel zijn, een lage extinctiecoëfficiënt hebben, of bij zure hydrolyse moeilijk vrij gemaakt worden verdient het de voorkeur  $f_i$  gelijk aan 1 te stellen. Anderzijds, wanneer de nauwkeurigheid gelijk is voor alle aminozuren (door bijvoorbeeld de hoeveelheid eiwit aan te passen voor de aminozuren van lage concentratie, of de hydrolyse-tijds-afhankelijkheidscurven te bepalen) verdient het aanbeveling om  $f_i = \frac{1}{R_i}$  te stellen. Katz nam voor  $h_i$  een waarde van  $\sqrt{3}$  voor de stabiele aminozuren. Aan proline, wegens zijn lage ninhydrine-waarden en aan leucine, valine en isoleucine die moeilijk hydrolyseerbare bindingen vormen, werd de waarde  $h_i = \sqrt{2}$  toegekend. Methionine, serine en threonine kregen een  $h_i = 1$  toegekend vanwege hun instabiliteit bij hydrolyse in 6N HCl. Katz kwam echter tenslotte tot de conclusie dat door  $h_i = 1$  te stellen men geen slechtere resultaten zou krijgen dan wanneer men de arbitrair gekozen "handicapping" factoren wel zou gebruiken. We hebben daarom voor alle aminozuren  $h_i = 1$  gesteld.

De getalwaarde van de experimentele fout in de concentratie van de aminozuren moet kleiner zijn dan het maximaal verschil tussen de gevonden waarde voor de aminozuursamenstelling van een bepaald aminozuur en zijn naaste gehele getal, namelijk 0,5, omdat op basis van dit verschil de juistheid van de waarde van het moleculairgewicht wordt beoordeeld; daarom werden bij een aangenomen fout bij de aminozuur-analyse van 5% alleen de aminozuren met een gehalte van minder dan acht residueën per mol bij de berekening betrokken. (zie tabel III).

#### IV.2.3. Resultaten en discussie

In tabel III zijn de aminozuur-analyses van de polypeptide-ketens van  $\alpha$ -crystalline weergegeven.

Tryptofaan werd bepaald volgens Bencze en Schmid (1957) en cysteïne als cysteïnezuur.

TABEL III

Aminozuur-analyse van de polypeptide-ketens van  
 $\alpha$ -crystalline

Aminozuur	Polypeptide-ketens	
	A	B
Lys	4,0	5,5
His	3,8	4,4
Arg	7,7	8,3
Asp	9,3	7,5
Thr	3,1	3,8
Ser	12,4	9,5
Glu	10,2	10,7
Pro	5,8	9,8
Gly	6,0	4,8
Ala	3,7	4,9
1/2 Cys	1,0	0
Val	6,0	5,4
Met	1,0	1,0
Ile	5,3	5,5
Leu	8,3	8,7
Tyr	2,9	1,1
Phe	8,5	7,6
Try	<u>1,1</u>	<u>1,0</u>
	100,2	99,5

In figuren 19 en 20 werd  $\Sigma(\frac{1}{R_i} D_i)^2$  uitgezet tegen X waarbij X gevarieerd werd van 0,7 tot 1,6. Uit de figuren blijkt dat minima optreden bij  $X = 1,19$  en  $X = 1,10$  voor resp. subeenheid A en B. Deze waarden corresponderen met moleculairgewichten van 11.900 resp. 11.000.



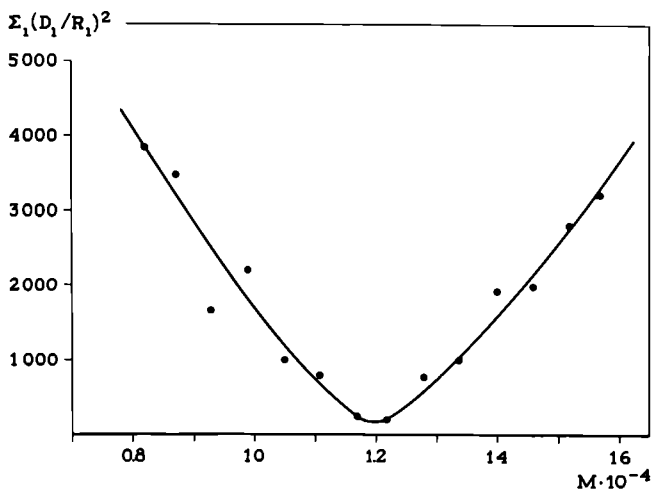


Fig. 19. Moleculairgewichtsbepaling van subeenheid A van  $\alpha$ -crystalline. Op de vertikale as zijn de relatieve afwijkingen uitgezet, terwijl op de horizontale as de arbitrair gekozen waarden voor het moleculairgewicht zijn uitgezet.

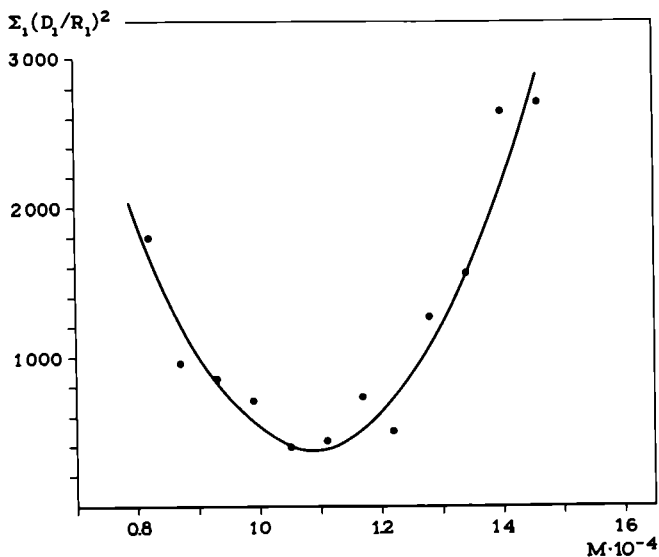
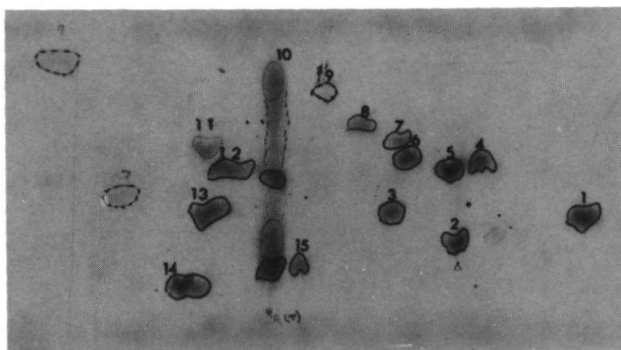


Fig. 20. Moleculairgewichtsbepaling van subeenheid B van  $\alpha$ -crystalline.

De gevonden waarden voor de moleculairgewichten werden bevestigd door peptide-kaarten verkregen na trypsine-digestie van de beide subeenheden (zie figuren 21 en 22). Deze leverden in beide gevallen veertien à zestien vlekken op, overeenkomend met de som van het aantal residueën berekend op het lysine en arginine gehalte (Léon et al 1970).



21 Peptide-kaart van subeenheid A van  $\alpha$ -crystalline. Elektroforese vond plaats in horizontale richting bij pH 6,4 bij 4000 V en 50 mA gedurende 90 minuten, De chromatografie werd in verticale richting uitgevoerd.

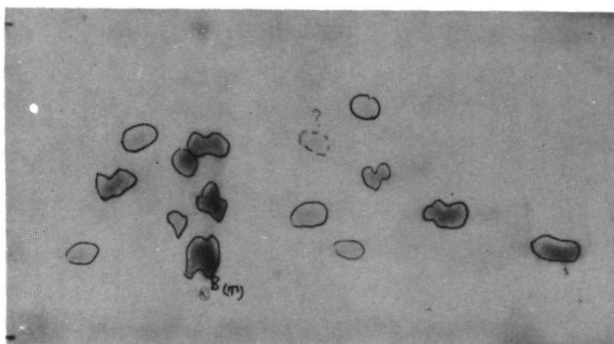


Fig. 22 Peptide-kaart van subeenheid B van  $\alpha$ -crystalline.

## HOOFDSTUK V

### ONDERZOEK NAAR DE N-TERMINUS VAN $\alpha$ -CRYSTALLINE

#### V.1. INLEIDING

Bloemendal (1957), Firfarova (1958) en Hähnel (1961) vonden glutaminezuur als N-terminaal aminozuur van  $\alpha$ -crystalline. De DNFB bepaling in ons laboratorium uitgevoerd op verder gezuiverd  $\alpha$ -crystalline, leverde slechts 1 mol glutaminezuur per  $2 \times 10^6$  g eiwit op. Deze hoeveelheid was te klein om met het moleculairgewicht van de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline in overeenstemming te kunnen worden gebracht. Koppeling van  $\alpha$ -crystalline m.b.v. DNFB in ureum leverde alleen sporen van verschillende aminozuren op. Deze bevindingen waren aanleiding om de N-terminus van  $\alpha$ -crystalline aan een verder onderzoek te onderwerpen.

Het uitblijven van de reactie van  $\alpha$ -crystalline met DNFB in ureum deed het vermoeden rijzen dat het N-terminale aminozuur geblokkeerd is, zoals eerder gesuggereerd was door Bloemendal et al (1965). Een andere mogelijkheid was, dat pyrrolidoncarbonzuur uit N-terminaal glutaminezuur ontstaan is. Deze laatste mogelijkheid werd onwaarschijnlijk gemaakt door het eiwit met 0,1N loog

te behandelen; in dit milieu vindt ringopening plaats waarbij glutaminezuur ontstaat. Dit aminozuur werd echter niet gevonden.

Als mogelijke blokkade werd gedacht aan:

- a. een suikergroep
- b. een formylgroep
- c. een acetylgroep.

Een aantal bepalingen werd uitgevoerd ten einde de blokkerende groep te identificeren. Daarbij kon tevens de sequentie van het N-terminale tetrapeptide worden opgehelderd.

## V.2. MATERIALEN EN METHODEN

### Inwerking van pronase

Alpha-crystalline werd aan enzymatische afbraak met pronase P onderworpen. Digestie vond plaats bij 37°C en pH 8,0. Het enzym werd opgelost in 0,05M ammoniumcarbonaat en 2 mM calciumchloride. De enzym-substraat verhouding was 1:50.

### Inwerking van subtilisine

Enzymatische afbraak van  $\alpha$ -crystalline vond plaats bij pH 8 in een pH-staat en bij kamertemperatuur. De verhouding enzym tot eiwit was 1:50.

### Isolatie van N-terminale geblokkeerde peptiden

Het peptide-mengsel verkregen door enzymatische afbraak van  $\alpha$ -crystalline werd op een Dowex 50-X2 kolom (1,2 x 90 cm) in de  $H^+$ -vorm gebracht. Het geblokkeerde peptide, dat door de hars niet wordt vastgehouden, werd met water geëluëerd.

## Sequentie-bepaling

Sequentie-bepaling geschiedde m.b.v. DFP-behandelde carboxypeptidase A. De reactie werd uitgevoerd bij pH 8,0 en bij 37°C. De enzym-substraat verhouding was 1:1. Op verschillende tijden werden monsters genomen, waarvan de reactie door aanzuren tot pH 3 gestopt werd.

## Hoogspanningselektroforese

Hoogspanningselektroforese werd uitgevoerd bij pH 6,5 en bij pH 3,5 om het geblokkeerde peptide te zuiveren. De gebruikte buffersystemen waren pyridine-azijnzuur-water in de resp. verhoudingen: 100:10:890 en 10:100:1890 (V/V). Het hierbij gebruikte apparaat was van het type Pherograph-Original Frankfurt. Een spanningsgradient van 25 V/cm werd gedurende 2 uur toegepast. Detectie vond plaats m.b.v. het Reindel-Hoppe reagens (1953). De oorspronkelijke procedure werd enigszins gemodificeerd (persoonlijke mededeling van dr. Tesser).

De chromatogrammen werden bespoten met bleekwater bevattende 11% NaClO (titrimetrisch bepaald met thiosulfaat), verdund met water (1:20 V/V) en gedurende minstens 3 uur in een luchtstroom gedroogd waarna ze in de stoof bij 45° gedurende 15 minuten gehangen werden. De chromatogrammen werden vervolgens besproeid met een o-toluidine oplossing bevattende 75 mg toluidine, 1 ml ijsazijn, 1 g kaliumjodide in 40 ml water. De peptiden kwamen eerst bruin te voorschijn en na enige minuten staan, werden de vlekken blauw.

## Dunnelaag-chromatografie

De chromatografie werd uitgevoerd op silicagel-platen. Als loopmiddel diende een mengsel van n-butanol, azijnzuur en water (4:1:1). Detectie vond plaats m.b.v. ninhydrine en het Reindel-Hoppe reagens. De verschillende tijdmonsters werden naast elkaar met test-verbindingen opgebracht. N-acetyl-methionine was een handelspreparaat.

### Reactie op koolhydraten m.b.v. het anthron-reagens

De reactie op suikers werd uitgevoerd volgens Hörmann & Gollwitzer (1962). Het anthron-reagens werd als volgt bereid:

Twee gram anthron werd opgelost in 1 l verdund zwavelzuur, bereid door 5 vol. geconcentreerd zwavelzuur te mengen met 2 vol. water.

In een ijsbad werd aan 1 ml  $\alpha$ -crystalline-oplossing 5 ml reagens toegevoegd. De oplossing werd 15 minuten verwarmd bij 100°C. Na afkoelen werd de extinctie bij 585 en bij 700 nm gemeten. Het verschil  $E_{585} - E_{700}$  is een maat voor het hexosegehalte.

### Reactie op koolhydraten d.m.v. zilvernitraat kleuring

De elektroferogrammen werden gedompeld in een oplossing die 5 g zilvernitraat opgelost in 2 ml water en 200 ml aceton bevatte, aan de lucht gedroogd en vervolgens gedompeld in een oplossing van 4 g NaOH in 100 ml water en 100 ml ethanol. Wanneer suikers aanwezig zijn, ontstaan bruine vlekken op een lichtbruine achtergrond die verdwijnt wanneer het papier in een 10% thiosulfaat-oplossing gedompeld wordt. De vlekken moeten dan zichtbaar blijven.

### Reactie op formyl-groepen

De mierenzuurbepaling geschiedde volgens de methode van Grant (1948). Het mierenzuur wordt omgezet in formaldehyde door reductie met magnesium en zoutzuur.

Twintig mg  $\alpha$ -crystalline werd opgelost in 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml geconcentreerd zwavelzuur werd toegevoegd. Hydrolyse vond plaats gedurende een half uur onder stikstof bij 110°C (R. Sarges et al 1965). Het hydrolysaat werd bij kamertemperatuur onder vacuum gedestilleerd. Het destillaat werd in een kolf, die in droogijs-acetonnengsel geplaatst was, opgevangen. De reductie van het opgevangen destillaat geschiedde gedurende 30 minuten met 15 mg magnesiumlint en 0,1 ml geconcentreerd zoutzuur. Aan het gereduceerde monster werd 1,5 ml chromotroopreagens bevattende 600 mg chromotroopzuur in 200 ml water en 180 ml geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Na kleurontwikkeling bij 110°C gedurende 30 minuten werden de extincties bij 575 m $\mu$  gemeten.

De te analyseren monsters moesten eerst met zoutzuur behandeld worden om het opgeloste koolzuur, dat gereduceerd zou kunnen worden uit de oplossing te verdrijven.

#### Kwalitatieve acetyl-bepaling

Peptide monsters werden bij 100°C gedurende 4 uur gehydrolyseerd in 2N HCl-methanol. Detectie vond bij 160°C plaats in een gaschromatograaf (Packard) uitgerust met een vlamionisatie-detector en een Poropak Q-kolom (180 x 0,4 cm) (Waters Assoc., Inc. Framingham Massachusetts, U.S.A.), met N<sub>2</sub> als dragergas.

#### Kwantitatieve acetyl-bepaling

Monsters  $\alpha$ -crystalline werden bij 110°C gedurende 16 uur in 2N HCl gehydrolyseerd (Schepherd G.R. en Noland B.J. 1968). Een gedeelte van de oplossing werd gebruikt voor gaschromatografie terwijl met de rest van de oplossing het eiwit gehalte d.m.v. aminozuur-analyse werd bepaald. De gaschromatograaf was een model 400 van F & M Scientific Corporation, Avondale, Pennsylvania, U.S.A. Als stationnaire fase voor de U-vormige kolom, (175 x 0,3 cm) werd weer Poropak Q gebruikt. De kolom-temperatuur was 180°C. De temperatuur van de vlamionisatiedetector was 200°C. Het dragergas was stikstof, de doorstroomsnelheid 50 ml per uur. De retentietijd van de azijnzuurpiek bedroeg 4 minuten. De oppervlakte van de piek werd planimetrisch bepaald en de hoeveelheid azijnzuur berekend door vergelijking met de oppervlakte van een referentie-azijnzuurpiek van een monster van bekende concentratie.

### V.3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

De suikerbepalingen op  $\alpha$ -crystalline waren negatief. Mierenzuur werd slechts in sporen gevonden. Met behulp van gaschromatografie kon, uitgaande van een N-geblokkeerd dipeptide, een methylacetaat piek worden aangetoond (zie fig. 23).

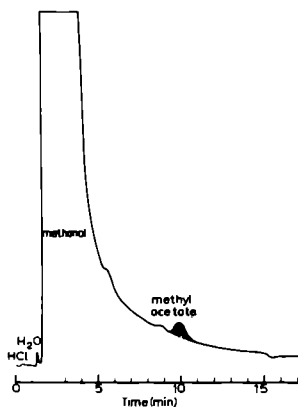


Fig. 23 Gaschromatogram verkregen op een Porapak Q-kolom bij 160°. Een geblokkeerde dipeptide werd gehydrolyseerd in 2N HCl-methanol.

Recente kwantitatieve acetyl bepalingen (Hoenders et al 1970) leverden 1 mol acetyl per 10.900 g  $\alpha$ -crystalline in tegenstelling tot de eerder in de literatuur opgegeven waarden van 1 mol acetyl per 24.000 g eiwit (Mok & Waley 1968), (Hoenders et al 1968). In beide gevallen was de methode van Ludowieg en Dorfman gebruikt, die blijkbaar te lage waarden oplevert (bevestigd door een systematisch onderzoek uitgevoerd door dr. K. de Groot).

Na behandeling van  $\alpha$ -crystalline met pronase werd met behulp van chromatografie op Dowex 50 en zuivering d.m.v. hoogspanningselektroforese, een geblokkeerde dipeptide gevonden, terwijl na splitsing van  $\alpha$ -crystalline door subtilisine een geblokkeerd tetrapeptide geïsoleerd kon worden (Hoenders et al 1968).

De sequentie van de geblokkeerde peptiden kon m.b.v. het enzym carboxypeptidase A worden opgehelderd. Het dipeptide leverde N-acetyl-methionine en asparaginezuur op, terwijl uit het tetrapeptide achtereenvolgens Ala, Ile, Asp en acetyl-Met vrijkwamen die d.m.v. dunnelaag chromatografie konden worden geïdentificeerd. De sequentie van het N-terminale peptide is dus N-acetyl-Met-Asp-Ile-Ala (zie ook hoofdstuk VI).



## HOOFDSTUK VI

### SCHEIDING EN BRUTO AMINOZUURSAMENSTELLING VAN OPLOSBAAR TRYPTISCHE PEPTIDEN VAN SUBEENHEID A

#### VI.1. INLEIDING

In hoofdstuk III is de scheiding van de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline besproken. Uit de aminozuur-analyses bleek dat de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  van subeenheid A dezelfde aminozuursamenstelling hadden. Dit was aanleiding om te veronderstellen dat de twee ketens verregaande overeenkomsten hebben. De elektroforetische mobiliteit van de ketens  $A_1$  en  $A_2$  op polyacrylamidegel bij pH 8,9 in 7M ureum was echter verschillend.

Om mogelijke chemische verschillen tussen de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  op te sporen, werden peptide-kaarten van de beide ketens aan een nauwkeurige analyse onderworpen. Tevens werden de tryptische peptiden geïsoleerd en de bruto aminozuursamenstelling ervan bepaald.

## VI.2. MATERIALEN EN METHODEN

### Isolatie van $\alpha$ -crystalline en de subeenheden

Alpha-crystalline werd bereid zoals in hoofdstuk II werd beschreven. De scheiding van de subeenheden is in hoofdstuk III vermeld.

### Isolatie van het N-terminale tryptische peptide van subeenheid A

Honderd mg van een tryptisch hydrolysaat van subeenheid A werd op Dowex 50-X2 gefractioneerd. Een lineaire gradient-elutie van 0,2M pyridine acetaat pH 3,1 naar 2M pH 5,0 werd toegepast. Tien procent van iedere fractie van 5 ml werd drooggedampt en gehydrolyseerd in 0,2 ml 13,5N NaOH gedurende 25 minuten bij 110°C. Het hydrolysaat werd geneutraliseerd met 0,35 ml ijsazijn, waarna de ninhydrine oplossing werd toegevoegd. Kleuring vond plaats in een kokend waterbad. De buizen werden bij 570nm doorgemeten. Lang en Meloun (1968) vermeldten de aanwezigheid van tryptofaan in het N-terminale peptide van  $\alpha$ -crystalline. Alle pieken werden daarom op de aanwezigheid van tryptofaan getest. De tryptofaan positieve piek werd drooggedampt en d.m.v. papierelektroforese en chromatografie gezuiverd.

### Blokkering en deblokkering van de $\epsilon$ -aminogroep van lysine

Ten einde een langer tryptisch N-terminaal peptide te kunnen isoleren, werd de aminogroep van de lysine residueën volgens de methode van Goldberger (1967) geblokkeerd met S-ethyl trifluorthioacetaat bij pH 10. Na tryptische afbraak werd de trifluoracetylgroep bij 0° met 1M piperidine verwijderd.

### Isolatie van het gemodificeerde N-terminale tryptische peptide d.m.v. continue vrije elektroforese

Een ruwe scheiding van de peptiden werd verkregen m.b.v. een apparaat voor continue vrije elektroforese van het type Elphor (Bender & Holbein, München). De elektroforese werd uitgevoerd bij 2900V en 80mA terwijl de temperatuur op

4°C constant gehouden werd. De elektrodenruimten werden gevuld met Tris-HCl buffer van pH 8,3 (29,1 g per liter). De scheidingskamer werd gevuld met de 9 maal verdunde buffer. De snelheid van de vloeistoffilm was 50 cm/uur. Honderd mg peptide-mengsel opgelost in 3 ml buffer werd met een snelheid van 2 ml/uur ingepompt. Het N-terminale peptide dat tryptofaan bevat, werd met het Ehrlich reagens gedetecteerd. Daartoe werd aan 0,5 ml van iedere fractie 1 ml van een oplossing bevattende 1 g p-dimethylaminobenzaldehyde, 95 ml aceton en 5 ml geconcentreerd zoutzuur toegevoegd.

#### Hoogspanningselektroforese op papier en dunnelaag-chromatografie

Elektroforese op Whatman 3MM papier werd bij 1100V en 60mA gedurende 90 minuten in pyridine-azijnzuur-water (100:10:890 v/v), pH 6,5 uitgevoerd. In sommige gevallen vond elektroforese in 1,64M mierenzuur bij 1500V en 60mA gedurende 1 uur plaats.

Dunnelaag-chromatografie werd uitgevoerd op silicagel-platen (D.C. Fertig Platten, Merck). Als loopmiddel werd n butanol-pyridine-azijnzuur-water (68:40:14:25 v/v) gebruikt.

De plaats van het N-terminale peptide werd gedetecteerd m.b.v. het Reindel-Hoppe reagens en het Ehrlich reagens. De elektroferogrammen en de chromatogrammen werden daartoe slechts aan de zijkanten bespoten zodat het grootste gedeelte uitgeknipt resp. afgekrabd kon worden. De extractie van het niet ingekleurde peptide geschiedde met 30% azijnzuur resp. 1M pyridine.

#### Tryptofaan en tyrosine gehalte

Het eiwit gehalte werd bepaald volgens Waddell (1956), m.b.v. de volgende vergelijking:

$c = 0,144 (E_{215} - E_{225})$ . Hierin is c de concentratie van het eiwit in g/l.

Oplossingen bevattende 0,4 mg eiwit in 1 ml 0,1N NaOH werden in een Beckman DB spectrofotometer die met een recorder was verbonden, doorgemeten. De tyrosine en tryptofaan gehalten werden volgens de methode van Bencze en Schmid (1957) uit het spectrum afgeleid.

## Gelfiltratie van tryptische peptiden op Sephadex G50

Voor de scheiding van de peptiden werd gebruik gemaakt van een Sephadex G50 kolom (2 x 300 cm). De elutie vond plaats met 0,2N azijnzuur. Het tryptische hydrolysaat werd opgelost in 4N azijnzuur. De oplosbare peptiden werden opgebracht na centrifugering van het onoplosbare gedeelte van het tryptische hydrolysaat. Detectie van de peptiden vond plaats door de extinctie van de fracties bij 280nm te meten.

## Scheiding van tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese

Een ruwe scheiding van de peptiden in drie groepen nl. de zuren de neutra en de basische peptiden werd verkregen d.m.v. continue vrije elektroforese. Als buffer werd gebruikt pyridine-acetaat, pH 4,9 (50 ml pyridine + 40 ml azijnzuur aangevuld tot 5 liter). Het voltage bedroeg 1900V en het amperage 170mA. Een 4%-ige peptide oplossing werd in het midden van de kamer ingebracht met een snelheid van 2 ml per uur. Detectie vond plaats door reactie met ninhydrine en meting van de extincties bij 570nm.

## Chromatografische scheiding van tryptische peptiden op Dowex 1

Dowex 1-X2 werd in de acetaat vorm gebracht. Als elutiemiddel werd het buffersysteem volgens Rudloff & Braunitzer (1961) gemodificeerd als beschreven door Frank (1968), gebruikt. Hieronder volgt een overzicht van de gebruikte buffers (i.p.v. 2,4 lutidine werd 2,6 lutidine gebruikt). Alle oplossingen werden tot 1 liter met water aangevuld met uitzondering van buffer 7.

Buffer 1 : 15 ml 2, 4, 6 collidine, 15 ml 2, 6 lutidine, 15 ml  $\alpha$ -picoline, aangezuurd met azijnzuur tot pH 8,4.

Buffer 2 : 20 ml 2, 6 lutidine, 20 ml  $\alpha$ -picoline, 30 ml pyridine, aangezuurd met azijnzuur tot pH 7,6.

Buffer 3 : 40 ml  $\alpha$ -picoline, 40 ml pyridine, aangezuurd met 5 ml azijnzuur tot pH 6,7.

Buffer 4 : 50 ml  $\alpha$ -picoline, 50 ml pyridine, aangezuurd met 20 ml azijnzuur tot pH 6,0.

Buffer 5 : 50 ml  $\alpha$ -picoline, 50 ml pyridine, aangezuurd met 80 ml azijnzuur tot pH 4,8.

Buffer 6 : 50 ml pyridine, 950 ml azijnzuur.

Buffer 7 : ijsazijn.

De buffers werden doorgepompt m.b.v. een Milton Roy pomp uitgerust met een Quadring van ethyleen-propyleen, keuze van materiaal van de Quadring is erg belangrijk, verkeerde materiaal keuze kan leiden tot verstopping van de kolom (gerding 1970). Het volume van het mengvat was 100 ml. De peptiden werden automatisch gedetecteerd volgens het systeem van Catravas (1964), enigszins gemodificeerd volgens Gerding (1970). Voor de detectie van de peptiden werd 20% van het eluaat genomen terwijl 80% naar de fractieverzamelaar geleid werd. De gebruikte kolom had een lengte van 100 cm en een doorsnede van 0,9 cm. De buffers werden doorgepompt met een snelheid van 20 ml/uur. De chromatografie werd uitgevoerd bij 40°C.

Honderddertig mg van een tryptisch hydrolysaat werd opgenomen in de start-buffer en werd na afdraaien van het onoplosbare gedeelte (z.g. "core") op de kolom gebracht.

Scheiding van tryptische peptiden volgens de "finger-printing" methode

De polypeptide-ketens werden door chromatografie op Biogel P<sub>2</sub> zoutvrij gemaakt. Als elutiemiddel werd 1% mierenzuur gebruikt. De polypeptide-ketens werden opgelost in een 0,1M ammoniumbicarbonaat opgelost (10 mg eiwit per ml buffer), waarna TPCK-behandelde trypsine (1:100) toegevoegd werd. Hydrolyse vond plaats bij 37°C gedurende 18 uur. De elektroforese werd uitgevoerd op Whatman 3MM papier in een Savant hoogspanningselektroforese-apparaat gedurende 90 minuten, bij 4000V en 50mA. Het gebruikte buffersysteem was pyridine-azijnzuur-water (200:8:2792 v/v) pH 6,4. Na de elektroforese werden de vellen bij 90°C gedurende 30 minuten gedroogd. Opstijgende chromatografie werd uitgevoerd in butanol-pyridine-azijnzuur-water (75:50:16:60 v/v). De peptiden werden gedetecteerd door de chromatogrammen te bespuiten met een ninhydrine oplossing (0,1 g ninhydrine in 100 ml aceton bevattende 1 ml pyridine en 1 ml ijsazijn). Na drogen bij 80°C gedurende 25 minuten werden alle peptiden zichtbaar. Vervolgens werden de vlekken uitgeknipt en met 1M pyridine geëxtraheerd en de extracten drooggedampt.

### VI.3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

#### N-terminale tryptische peptide

De Dowex 50-X2 chromatografie leverde één tryptofaan-positieve piek op. Deze piek bleek bij elektroforese heterogeen te zijn. Verdere zuivering d.m.v. papier-elektroforese en chromatografie leverde één tryptofaan-positieve band op, die een positieve Reindel-Hoppe reactie vertoonde terwijl de reactie met ninhydrine negatief was. Aminozuur-analyse van het geïsoleerde peptide leverde de volgende aminozuren op:

Met, Asp, Ile<sub>2</sub>, Ala, Glu, Pro, Phe, Lys, His.

#### Isolatie van het gemodificeerde N-terminale tryptische peptide

De scheiding van het mengsel gemodificeerde tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese leverde een vrij beperkte tryptofaan-positieve zone op (zie fig. 24). Na papier-elektroforese bij pH 6,5 werd een tryptofaan-positieve zone gevonden die extractie, droggvriezen en dunnelaag-chromatografie op silicagel een zuiver peptide opleverde van de volgende samenstelling:

Met, Asp, Ile<sub>2</sub>, Ala, Glu, Pro, Phe, Lys, His, Arg.

Rekening houdend met de resultaten van Corran en Waley (1969) en onze eigen resultaten (Léon et al 1970) moet de sequentie van het N-terminale peptide als volgt zijn:

N-acetyl-Met-Asp-Ile-Ala-Ile-Glu-His-Pro-Try-Phe-Lys-Arg.

Ten einde de sequentie achter het geblokkeerde lysine meer direct aan te tonen werd de trifluoracetylgroep verwijderd en het peptide opnieuw aan tryptische afbraak onderworpen. Het reactie product werd naast test-aminozuren bij pH 1,6 geëlektroforeerd. Behalve het N-terminale peptide werd slechts één aminozuur gedetecteerd dat dezelfde mobiliteit had als arginine. Ook aminozuur-analyse van het ongehydrolyseerd N-terminale peptide na reïncubatie met trypsine, leverde arginine op.

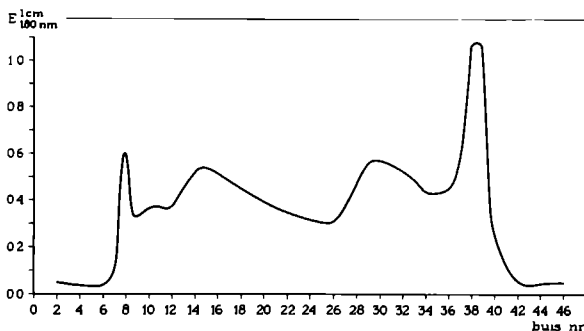


Fig. 24 Scheiding van een mengsel gemodificeerde tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese. De elektroforese werd uitgevoerd bij 2900V en 80mA. De temperatuur werd constant gehouden op 4°C. Tris HCl buffer pH 8,3 werd gebruikt. De snelheid van de vloeistoffilm was 50 cm per uur. Buizen 27 - 35 waren tryptofaan positief.

#### Gelfiltratie van tryptische peptiden op Sephadex G50

Gelfiltratie op Sephadex G50 kan slechts als voorscheiding gebruikt worden. De scheiding vindt plaats op grond van verschillen in het molgewicht van de diverse peptiden. In ons geval werd een scheiding in vier groepen verkregen (zie fig. 25).

#### Scheiding van tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese

De scheiding d.m.v. continue vrije elektroforese van een tryptisch hydrolysaat leverde drie groepen peptiden nl. de zuren, de neutrale en de basische peptiden, op (zie fig. 26). Deze methode is zeer geschikt om van een complex mengsel peptiden, een partiële scheiding in de bovengenoemde drie groepen met hoge opbrengsten te verkrijgen.

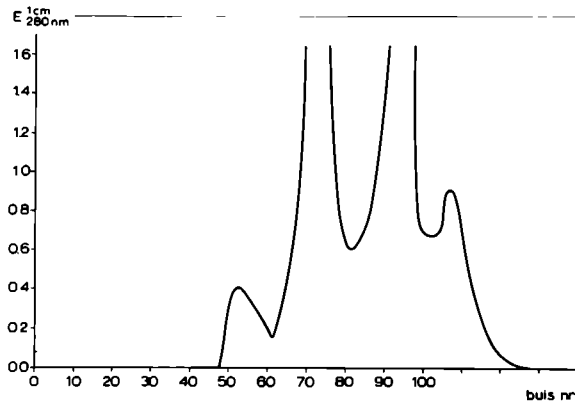


Fig. 25 Gelfiltratie op Sephadex G50 van een mengsel tryptische peptiden.  
 Elutie vond plaats met 0,2N azijnzuur.  
 Kolomdimensies : 2 x 300 cm.  
 Fracties van 5 ml werden opgevangen.

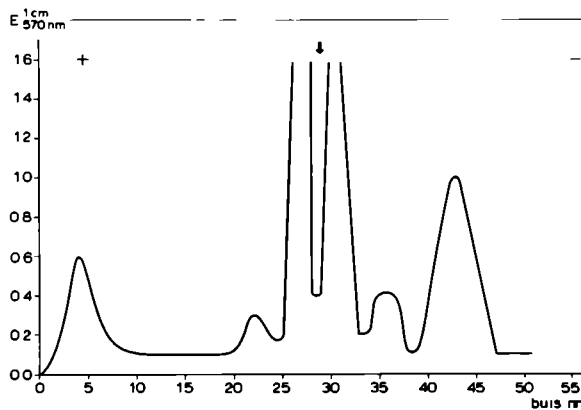


Fig. 26 Scheiding van een mengsel tryptische peptiden d.m.v. continue vrije elektroforese. Als buffer werd gebruikt pyridine-acetaat pH 4,9. Het voltage bedroeg 1900V en het amperage 170mA. Detectie vond plaats door reactie met ninhydrine reagens.



## Chromatografie op Dowex 1-X2

Chromatografie op Dowex 1-X2 leverde een 13-tal pieken op (zie fig. 27). Iedere piek afzonderlijk werd aan preparatieve papier-chromatografie onderworpen. Na elutie van de peptiden van het papier en hydrolyse in 6N HCl werd de bruto aminozuursamenstelling bepaald (zie tabel IV).

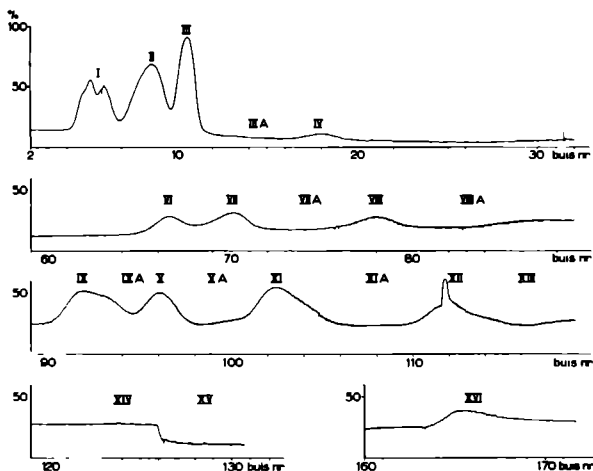


Fig. 27 Chromatografische scheiding van een tryptisch hydrolysaat van subeenheid A op Dowex 1-X2.

Elutie vond plaats met buffer 1 tot buis 10, vervolgens werd resp. buffer 2 gebruikt tot buis 35, buffer 3 tot buis 65, buffer 4 tot buis 95, buffer 5 tot buis 130 en tenslotte buffer 6.

De peptiden werden gedetecteerd door reactie met het ninhydrine reagens.

De transmissie werd gemeten bij 570nm.

Kolomdimensies : 0,9 x 100 cm.

Elutiesnelheid : 20 ml per uur.

TABEL IV

Bruto aminozuursamenstelling van de oplosbare tryptische peptiden  
van subeenheid A van  $\alpha$ -crystalline

Peptide nummer*	Aminozuursamenstelling
1 (I)	Arg.
2	Ser, Pro, Gly, Lys.
3	Glu, Phe, His, Arg.
4	Ser, Glu, Ile, Leu, Phe, Lys.
5 (IV)	Tyr, Arg.
6 (I)	Ser, Pro, Ala, Val, Ile, Arg.
7 (III)	Ser, Glu, Leu, Phe, Arg.
8 (II)	Thr, Ser, Pro <sub>2</sub> , Gly, Leu, Tyr, Phe, Arg.
9	Asp, Thr, Ser <sub>2</sub> , Glu, Pro, Ala, Ile <sub>2</sub> , Phe (sporen tyrosine).
10	Asp, Glu, Pro, Ala, Met, Ile <sub>2</sub> , Try, Phe, His, Lys.
11 (IX)	Asp, Ser, Glu, Gly, Val, Ile, Leu, Arg.
12 (XII)	Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Val, Leu, Phe, His, Lys.
13 (XIII)	Asp, Glu <sub>2</sub> , Gly, Val <sub>2</sub> , Ile, Phe, His, Lys.
14 (X)	Ser <sub>3</sub> , Glu, Pro, Ala, Lys.
15 (VII)	Asp, Glu, His, Arg.
16 (XV)	Asp <sub>2</sub> , Ser, Glu, Gly, Ile, His, Arg verontreinigd met Ala, Ile, Lys.

\* : De arabische getallen geven de peptiden geïsoleerd uit de peptide-kaarten aan, terwijl de romeinse getallen de plaats in het elutiepatroon van de Dowex 1 kolom weergeven.

## Peptide-kaarten

De tryptische peptiden, verkregen door een 30-tal peptide-kaarten te maken en de verkregen overeenkomstige vlekken na elutie te combineren, werden aan hydrolyse in 6N HCl gedurende 22 uur onderworpen. Het resultaat is in tabel IV samengevat. De peptide-kaarten zijn in de figuren 16 en 17 (hoofdstuk III) weergegeven. De peptide-kaarten van de polypeptide-ketens  $A_1$  en  $A_2$  bleken verregaande overeenkomsten te vertonen. Op twee peptiden na (vlek 2 en vlek 15) waren de kaarten identiek. Vlek 15 was alleen bij polypeptide-keten  $A_2$  te zien terwijl vlek 2 alleen bij polypeptide-keten  $A_1$  te voorschijn kwam.

Cysteïne is niet teruggevonden in de geïsoleerde peptiden. Voor de bereiding van de subeenheden werd nl. gecarboxymethyleerd  $\alpha$ -crystalline gebruikt, waarin dus cysteïne omgezet was in carboxymethyl cysteïne; dit gemodificeerd aminozuur kon op de aminozuuranalyse-diagram niet teruggevonden worden.

## Bepaling van tyrosine en tryptofaan

De tyrosine en tryptofaan-gehalten bepaald volgens de methode van Bencze en Schmid, leverde 1 mol tryptofaan en 3 mol tyrosine per 12.000 g A-keten op (zie tabel V).

TABEL V

Tryptofaan en tyrosine-gehalte van de zure polypeptide-ketens

Preparaat	Moleculaire ratio Tyr : Try	Mol % Try	Mol % Tyr
A	3,3	1,0	3,4
$A_1$	2,6	1,1	2,9
$A_2$	3,45	1,0	3,2

## SAMENVATTING

In dit proefschrift werden twee methoden voor de bereiding van het lenseiwit  $\alpha$ -crystalline beschreven:

continue vrije elektroforese en precipitatie gecombineerd met gelfiltratie.

De scheiding van de subeenheden van  $\alpha$ -crystalline werd verkregen d.m.v. chromatografie op SE Sephadex, bij pH 3,2. De polypeptide-ketens werden geïsoleerd door chromatografie op SE Sephadex bij pH 5,5 en door chromatografie op DEAE Sephadex bij pH 7,5. De polypeptide-ketens van subeenheid B konden tevens d.m.v. isofocussing gescheiden worden.

De verregaande overeenkomst tussen de polypeptide-ketens, werd vastgesteld d.m.v. aminozuur-analyses en peptide-kaarten.

Het molecuulgewicht van de polypeptide-ketens werd in desaggregerende media bepaald. Het molecuulgewicht bleek belangrijk lager te zijn dan tot dusver vermeld in de literatuur. De mogelijkheid van het ontstaan van een breuk in de polypeptide-ketens bij lang incuberen in de diverse desaggregerende media werd d.m.v. eindgroepbepalingen onwaarschijnlijk.

Moleculairgewichtsbepalingen van de polypeptide-ketens volgens een numerieke kleinste-kwadraat-methode leverde eenzelfde lagere waarde op. Het aantal tryptische peptiden door "finger-printing" verkregen, was in overeenstemming met de bovengenoemde waarde voor het molecuulgewicht.

De blokkerende groep aan het N-terminale aminozuur werd geïdentificeerd als een acetylgroep.

De aminozuursamenstelling van de oplosbare tryptische peptiden van de "zure" subeenheid werd bepaald. In ieder van de polypeptide-ketens bleek er één peptide te zijn dat bij de andere ontbrak. Beide peptiden werden geïsoleerd en geanalyseerd.

De  $\epsilon$ -lysine-residueën van subeenheid A werden geblokkeerd. Hierna werd het N-terminale tryptische peptide geïsoleerd en de sequentie ervan bepaald.

## SUMMARY

In this thesis two methods for the isolation of the lens protein  $\alpha$ -crystallin have been described:

continuous free electrophoresis and precipitation techniques combined with gel chromatography.

The separation of the subunits of  $\alpha$ -crystallin was carried out on SE Sephadex at pH 3,2, whereas the constituting polypeptides could be isolated either on SE Sephadex at pH 5,5 or on DEAE Sephadex at pH 7,5.

The polypeptides of subunit B were also isolated by electro-isofocussing. The close similarity between the polypeptides of the same subunit has been demonstrated by amino acid analysis and peptide mapping.

The effect of denaturing agents on the molecular weight of the different chains was also studied. The molecular weight of the polypeptides was determined after 3 days incubation in denaturing media. The value of the molecular weight determined according to Archibald turned out to be lower than the value so far mentioned in the literature. The possibility of chain degradation has been ruled out by endgroup analysis. Molecular weight determination according to the least square method of Katz yielded the same value.

The number of spots after finger-printing of tryptic hydrolysates confirmed the new value for the molecular weight.

The blocking group at the N-terminus of all chains was identified.

The amino acid composition of the soluble tryptic peptides of the acid chain was determined. In each of the polypeptide chains one peptide was present which was lacking in the other one. Both peptides have been isolated and analysed.

The  $\epsilon$ -lysine residues of the acidic subunit have been blocked. Thereafter the N-terminal tryptic peptide was isolated and the sequence determined.

## LITERATUUR

- ANSEVIN, A.T. (1968) Biophys. Chem. A98,8.
- BENCZE, W.L., en SCHMID, K. (1957) Anal. Chem. 29,1193.
- BERGMAYER, H. (1963) Verlag Chemie.
- BJORK, I. (1963) Exptl. Eye Res. 2,339.
- BJORK, I. (1964) Exptl. Eye Res. 3,1.
- BJORK, I. (1964) Exptl. Eye Res. 3,16.
- BLACKBURN, S., en LOWTHER, A.G. (1951) Biochem. J. 48,126.
- BLOEMENDAL, H. (1957) Dissertatie, Gem. Univ. Amsterdam.
- BLOEMENDAL, H., en CATE, G. ten (1959) Arch. Biochem.  
Biophysics 84,512.
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., JONGKIND, J.F., en WISSE, J.H.  
(1962) Exptl. Eye Res. 1,300.
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., JONGKIND, J.F., en WISSE, J.H.  
(1962) Nature [London] 193,437.
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., JONGKIND, J.F., en WISSE, J.H.  
(1964) Biochim. Biophys. Acta 82,192.
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., JONGKIND, J.F., en WISSE, J.H.  
(1965) Exptl. Eye Res. 4,319.



- BLOEMENDAL, H. (1969) Exptl. Eye Res. 8,227.
- BONT, W.S., WISSE, J.H., JONGKIND, J.F., en BLOEMENDAL, H.  
(1962) Biochim. Biophys. Acta 59,512.
- CATRAVAS (1964) Anal. Chem. 36,1146.
- CHARLWOOD, P.A., PITT-RIVERS, R., en SCHWARTZ, H.L. (1970)  
Biochem. J. 116,769.
- CORRAN, P.H., en WALEY, S.G. (1969) Biochem. J. 115,789.
- DAM, A.F. van, en CATE, G. ten (1966) Biochim. Biophys. Acta  
121,183.
- DAM, A.F. van (1967) Dissertatie, Nijmegen.
- EASLY, C.W. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107,386.
- FIRFAROVA, K.F. (1958) Biokhimiya 23,129.
- FRANÇOIS, J., RABAEY, M., en WIEME, R.J. (1955) A.M.A. Arch.  
Ophthalmol. 53,481.
- FRANK, G. (1968) Dissertatie, München.
- GRANT, en MORTON, W. (1948) Anal. Chem. 20(III),267.
- GRAY, W.R. (1967) Methods in Enzymology Volume XI Academic  
Press.
- GROOT, K. de, REIJNEN, J.C.M., en HOENDERS, H.J. (1968) Anal.  
Chem. 30,212.
- GROOT, K. de, HOENDERS, H.J., GERDING, J.J.T., en BLOEMENDAL,  
H. (1970) Biochim. Biophys. Acta 207,202.
- GROOT, K. de, LEON, A.E., HOENDERS, H.J., en BLOEMENDAL, H.  
(1970) Exptl. Eye Res. in press.
- HÄHNEL, R. (1961) v. Graefes Arch. Ophthalmol. 163,283.
- HANNIG, K. (1964) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 338,211.
- HANSON, H., GLÄSSER, D., en KIRSCHKE, H. (1965) Hoppe-Seyler's  
Z. Physiol. Chem. 340,107.
- HARMSSEN, J.M., DAM, A.F. van, en OS, G.A.J. van (1966) Biochim.  
Biophys. Acta 126,540.

- HOENDERS, H.J., en Bloemendal, H. (1967) Biochim. Biophys. Acta 147,183.
- HOENDERS, H.J., TOL, J. van, en BLOEMENDAL, H. (1968) Biochim. Biophys. Acta 160,283.
- HOENDERS, H.J., SCHOENMAKERS, J.G.G., GERDING, J.J.T., TESSER, G.I., en BLOEMENDAL, H. (1968) Exptl. Eye Res. 7,291.
- HOENDERS, H.J., GROOT, K. de, GERDING, J.J.T., en BLOEMENDAL, H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 188,162.
- HORMANN, H., en Gollwitzer, R. (1962) Liebigs Ann. Chem. 655, 178.
- KATZ, E.P. (1968) Anal. Biochem. 25,417.
- LANG, B.A., en MELOUN, B. (1969) Symposium over Biochemie van de lens, geciteerd door H. Bloemendal Exptl. Eye Res. 8,228.
- LÉON, A.E., GERDING, J.J.T., GROOT, K. de, HOENDERS, H.J., en BLOEMENDAL, H. (1970) International Journal of Protein Research in press.
- LÉON, A.E., GROOT, K. de, en BLOEMENDAL, H. (1970) Exptl. Eye Res. in press.
- LEVY, A.L. (1954) Nature 174,126.
- LUDOWIEG, J., en DORFMAN, A. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38, 212.
- MANSKY, W., HALBERT, S.P., en AUERBACH, T.P. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 92,512.
- MOK, C.C., en WALEY, S.G. (1967) Biochem. J. 104,128.
- MOK, C.C., en WALEY, S.G. (1968) Exptl. Eye Res. 7,148.
- MORNER, C.Th. (1894) Z. Physiol. Chem. 18,61.
- ORZALESI, F., en MIGLIOR, M. (1957) Ann. Ottalmol. e Clin. Oculist 83,721.
- PAPACONSTANTINOU, J., en RESNIK, R.A. (1958-1959) Ann. Repts. Carnegie Inst., Wash., 379.
- PAPACONSTANTINOU, J., en RESNIK, R.A. (1959-1960) Ann. Repts. Carnegie Inst., Wash., 378.
- PAPACONSTANTINOU, J., RESNIK, R.A., en SAITO, E. (1962) 60,205. Biochim. Biophys. Acta 60,205.

- REINDEL-HOPPE (1954) Chem. Berichte 87,1103.
- RUDLOFF, V., en BRAUNITZER, G. (1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 323,129.
- SANGER, F., en TUPPY, H. (1951) Biochem. J. 49,463.
- SARGES, R. (1965) Journal Amer. Chem. Soc. 87,2011.
- SCHOENMAKERS, J.G.G., en BLOEMENDAL, H. (1968) Biophys. Res. Commun. 31,257.
- SCHOENMAKERS, J.G.G., MATZE, R., POPPEL, M. van, en BLOEMENDAL, H. (1969) International Journal of Protein Research 1,1.
- SCHOENMAKERS, J.G.G., GERDING, J.J.T., en BLOEMENDAL, H. (1969) European J. Biochem. 11,472.
- SCHWERT, G.W., en TAKENAKA, Y. (1955) Biochim. Biophys. Acta 16,570.
- SHAPIRO, A.L. (1968) Invest. Ophtalmol. 7,462.
- SHEPHERD, G.R., en NOLAND, B.J. (1968) Anal. Biochem. 26,325.
- SPECTOR, A. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38,191.
- SPECTOR, A. (1963) J. Biol. Chem. 238,1353.
- SPECTOR, A. (1964) Invest. Ophtalmol. 2,182.
- SPECTOR, A., en KATZ, E. (1965) J. Biol. Chem. 240,1979.
- STARK, G.R., en SMYTH, D.G. (1963) J. Biol. Chem. 238,214.
- WADDELL, W.J. (1956) J. Lab. Clin. Med. 48,311.
- WALEY, S.G. (1965) Biochem. J. 96,722.
- WISSE, J.H., ZWEERS, A., JONGKIND, J.F., BONT, W.S., en BLOEMENDAL, H. (1966) Biochem. J. 99,179.
- WOOD, D.C., en BURGESS, L. (1961) Amer. J. Ophtalmol. 51,305.



# STELLINGEN

## I

De bewering van Liew et al. dat de eiwitbiosynthese in dierlijke systemen met acetyl serine begint, is aan bedenkingen onderhevig.

C.C. Liew, G.W. Haslett, V.G. Allfrey (1970).  
Nature 226, 414.

## II

De mogelijkheid van onvolledige dissociatie van  $\alpha$ -crystalline ter verklaring van de complexiteit van de polyacrylamidegel-patronen, is door Wisse et al. niet voldoende onderzocht.

J.H. Wisse, A. Zweers, J.F. Jongkind, W.S. Bont,  
H. Bloemendal (1966). Biochem. J. 99, 179.

## III

De moleculairgewichtsbepaling volgens de evenwichtsmethode, gebruikmakend van Schlieren-optiek, is aan bedenkingen onderhevig.

## IV

Het is aan te bevelen een grondige bestudering van de quaternaire structuur van eiwitten aan de primaire structuuropheldering te laten voorafgaan.

## V

De hoge specificiteit waarmee antilichaamvorming in het algemeen optreedt, wettigt de synthese van eenduidige immunogenen.

## VI

Het bepalen van het exakte isoëlektrische punt van de individuele componenten van een mengsel van eiwitten d.m.v. isofocussing, kan het uitzoeken van de omstandigheden voor de preparatieve scheiding op ionenwisselaars, aanzienlijk vergemakkelijken.

## VII

Gezien de tegenwoordige inflatie van de gulden, komt het heffen van belasting op rente, op belasten van schijnbare inkomens neer.

## VIII

Belasting op talent zoals voorgesteld door Professor Tinbergen is aan zeer ernstige bedenkingen onderhevig.

A.E. Léon  
24 september 1970

